Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Schütte

WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG VON OESTRADIOL-17β AUF ANDROGENE IN GEWEBESCHNITTEN UND LEBER-MIKROSOMEN VON RATTEN

Ein Beitrag zum Stoffwechsel von Steroidhormonen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1970

vorgelegt von
Kunhard Pollow
aus Berlin

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Schütte

WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG VON OESTRADIOL-17ß AUF ANDROGENE IN GEWEBESCHNITTEN UND LEBER-MIKROSOMEN VON RATTEN

Ein Beitrag zum Stoffwechsel von Steroidhormonen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Pollow, Kunhard

aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Herbert L a x

Referent: Professor Dr.rer.nat. Dipl.Chem. Martin W e n z e l

Korreferent: Professor Dr.med. Helmut C o p e r

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 29.Juni 1970

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung und Problemstellung	Seite 1
B.	Material und Methodik	Seite 5
C.	Ergebnisse	Seite 10
C 1.	Versuche zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten	Seite 10
C 1a.	Sexualcharakteristika der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion und Identifizierung der freien Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite	Seite 10
C 1b.	Untersuchungen über den Ort des Tritium-Einbaus im Steroidgerüst bei der Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion	Seite 14
C 1c.	Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen NAD bzw. NADP-generierenden Systemen	Seite 14
C 1d.	Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität des Tritiumacceptors Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen Androgenen	Seite 17
C 1e.	Einfluß der Oestradiol-17α-T-Konzentration auf die Tritium-Übertragung auf Δ^4-Androsten-3,17-dion	Seite 19
C 1f.	Anteil des Oestradiol-Wasserstoffs bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion zu Testosteron und Ring-A-gesättigten Androstandiolen in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten	Seite 22
C 2.	Untersuchungen zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Niere, Diaphragma und Sexualorganen männlicher Ratten	Seite 23
C 3.	Untersuchungen zur Gewebsspezifität der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Placenta, Ovarien, Uterus und Leber von trächtigen Ratten	Seite 24
C 3a.	Identifizierung der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite	Seite 24
C 3b.	Der Einfluß der Steroid-Konzentration auf die Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in der Placenta	Seite 28
C 3c.	Anteil des Oestradiol-Wasserstoffs bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion zu Testosteron in Placenta und Ovar	Seite 31
C 3d.	Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität des Tritiumacceptors Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen Androgenen	Seite 32

C 4. Untersuchungen mit der Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten — Seite 35

C 4a. Bildung Tritium-markierter Androstendion-Metabolite durch Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T und Identifizierungsmaßnahmen — Seite 35

C 4b. Coenzymspezifität — Seite 38

C 4c. Kinetische Untersuchungen — Seite 39

C 4d. Versuche zur Temperaturabhängigkeit des Wasserstoff-Transfers — Seite 44

C 4e. Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung des Wasserstoff-Transfers — Seite 44

C 5. Untersuchungen zur Stereospezifität der enzymatischen Tritium-Übertragung mittels NADP zur Hydrierung der Doppelbindung in Ring A und der Ketogruppen — Seite 46

D. Diskussion — Seite 50

D 1. Zur Frage der Sexualspezifität der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite — Seite 53

D 2. Organspezifität — Seite 56

D 3. Dient Oestradiol als vorwiegendes Reduktionsmittel bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion? — Seite 57

D 4. Die Kompartimentierung des NAD bzw. NADP und die Stereospezifität der enzymatischen Hydrierung mittels NADP der Doppelbindung in Ring A und der Keto-Gruppen — Seite 59

D 5. Hat die spezifische Wasserstoff-Übertragung zwischen Steroiden eine Bedeutung? — Seite 62

D 6. Beziehung zur Hypothese der "Transhydrogenase-Funktion" von Hydroxy-Steroiden — Seite 63

E. Zusammenfassung — Seite 65

F. Literatur — Seite 67

A. Einleitung und Problemstellung

Die Einführung empfindlicher Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Steroiden in biologischem Material hat in den letzten Jahren eine Fülle neuer Befunde zutage gefördert, die zum überwiegenden Teil eine Aufschlüsselung der reduktiven und der oxydativen Veränderungen im Zwischenstoffwechsel von Sexualhormonen zulassen. Zum Beispiel ist erkannt worden, daß unter den Reaktionen, denen die Androgene im reduktiven Zwischenstoffwechsel unterliegen, zwei als die wichtigsten allen übrigen Veränderungen am Molekül voranstehen: die Hydrierung im Ring A durch sogenannte Ring-A-Hydrogenasen und die nachfolgende Reduktion der Oxogruppen von C-3 und C-17 [1,2]. Beide Reaktionen führen von der biologisch-aktiven Verbindung zum ausscheidungsfertigen Endprodukt [sulfatierte und glucuronisierte Androstan- monoole und -diole] und für beide Reaktionen verfügt die Leber, der Hauptort des Zwischenstoffwechsels für Sexualhormone, über eine Reihe stereo-spezifischer Enzyme.
Als Schlüsselenzyme des Umsatzes der Androgene mit Δ^4-3-Oxo-Konfiguration haben unter den Ring-A-Hydrogenasen die Δ^4-Steroid-Reduktasen zu gelten. [3,4,5,6,7]

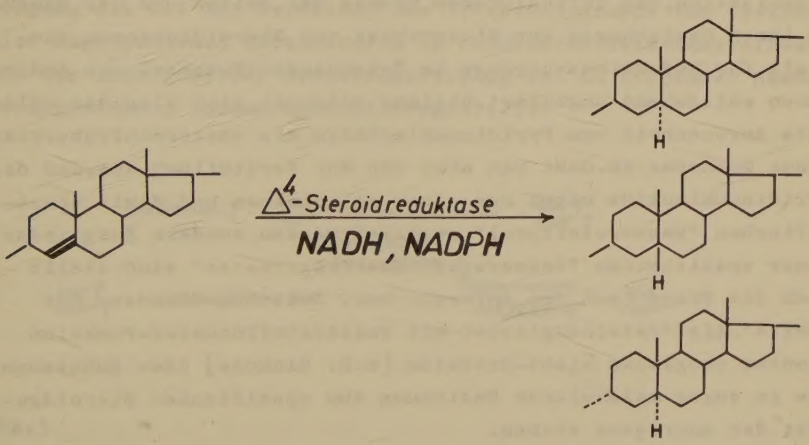


Abb. 1 Reduktion der 4,5-Doppelbindung in Ring-A des Steroidgerüstes

Denn die Steroid-Reduktasen [siehe Abb.1] katalysieren mit hoher Substratspezifität die irreversible Hydrierung der Doppelbindung von C-3 nach C-4 und damit den ersten Schritt im Zwischenstoffwechsel der Androgene.Als wasserstoffübertragende Coenzyme dienen NADH bzw. NADPH.Δ^4-Steroid-Reduktasen sind sowohl in mikrosomalen Strukturen [5α-Derivate] [8,9,10,11,12] als auch in löslichen Plasmafraktionen [5ß-Derivate] [13] der Leberzelle lokalisiert.
Die von den 3- und 17-Hydroxy-Steroid-Oxydoreduktasen [siehe Abb.2] katalysierten Reaktionen sind reversibel,weisen keine hohe Substratspezifität auf und reagieren als tierische Enzyme mit NADH bzw. NADPH als Wasserstoffdonatoren.[14,15,16,17,18,19]

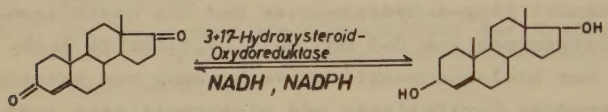


Abb.2 Reduktion der 3- und 17-Oxogruppen

Im Zusammenhang mit diesem Problem des enzymatischen Mechanismus der Hydrierung des Androgenmoleküls ist von Interesse die Herkunft des Wasserstoffs,des reduzierenden Agens.Noch heute sind die verzweigten Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation,den verschiedenen Räumen der Zellen und der Gewebe in ihren Beziehungen zur Biosynthese von Steroidhormonen,speziell für Reduktionsvorgänge im Zwischenstoffwechsel von Androgenen weitgehend ungeklärt.Bislang zeichnet sich klar die obligate Anwesenheit von Pyridinnukleotiden als wasserstoffübertragende Coenzyme ab.Geht man aber von der Vorstellung aus,daß die Pyridinnukleotide nicht aus einem allgemeinen und damit unspezifischen "Wasserstoffpool" gespeist werden sondern Endglieder einer spezifischen "Wasserstoff-Überträgerkette" sind,stellt sich die Frage nach den Anfangs- bzw. Zwischen-Gliedern der "Kette".Als "Zwischenglieder mit Wasserstoffdonator-Funktion könnten fungieren Nicht-Steroide [z.B. Glukose] oder Substanzen, die in enger molekularer Beziehung zum spezifischen Steroidgerüst der Androgene stehen.

Unter diesen Aspekten werden in der vorliegenden Arbeit auf ihre spezifische Wasserstoffdonator-Wirkung bei der Androgenhydrierung Glukose, Glycerin, Glutamat und Laktat als unspezifische NAD, NADP-generierende Systeme untersucht sowie Oestradiol als spezifische, den Androgenen in molekularer Beziehung nahestehende Substanz. Das Hauptaugenmerk liegt auf Oestradiol, da Oestradiol in enger molekularer und biochemischer Beziehung zu Androgenen steht und als gegengeschlechtliches Steroidhormon die männliche Sexualhormonwirkung abschwächend beeinflußt.

Wie die folgenden Untersuchungen zeigen werden [20,21,22,23], mobilisiert Oestradiol den für die Androgenhydrierung notwendigen Wasserstoff in bevorzugter und spezifischer Weise. Der Vorgang ist gebunden: 1. an die oxydative Abspaltung des in 17-Position an Oestradiol gebundenen Wasserstoffs unter Bildung von Oestron, 2. an die Zwischenschaltung von Pyridinnukleotiden, die intermediär den Wasserstoff koppeln, 3. an Androgene, die reduzierbare Ketogruppen tragen und 4. an ein Enzymsystem, das zwischen Oestradiol und Androgenen Transhydrogenase-Funktion ausübt.

Die Untersuchungen werden mit Oestradiol durchgeführt, das in 17α-Stellung Tritium-markiert ist. Die sogenannte stoffwechsellabile Tritium-Markierung ermöglicht in idealer Weise die Verfolgung des bei der Oxydation der 17-Hydroxygruppe von Oestradiol abgespaltenen Wasserstoffs im reduktiven Zwischenstoffwechsel der Androgene. Der Reduktionsvorgang ist in folgender Reaktionsgleichung zusammengefaßt dargestellt:

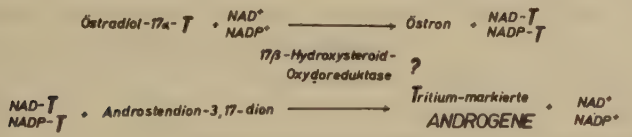


Abb. 3

Im Hinblick auf die oben dargestellte zentrale Bedeutung der

Leber im reduktiven Zwischenstoffwechsel der Steroidhormone wird in der folgenden Arbeit Lebergewebe von Ratten verwendet [Leberschnittpräparationen und Mikrosomenfraktion]. Da seit einiger Zeit bekannt ist, daß die an der Steroidhydrierung beteiligten Enzyme in ihrer stereospezifischen Wirkung geschlechtsabhängig sind [24,25,26,27,28], werden die Versuche mit Lebern von männlichen und weiblichen Ratten unternommen, um etwaige weitere Geschlechtsspezifitäten aufzudecken.

Daneben findet sexualhormon-unspezifisches Gewebe [Niere, Diaphragma], sexualhormon-produzierendes Gewebe [Ovarien, Placenta, Hoden] und Zielorgane der Sexualhormonwirkung [Uterus, Samenblase] Verwendung. Damit soll eine mögliche Organspezifität der wasserstoffübertragenden Reaktion zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion erfaßt werden.

B. Material und Methodik

Tiere

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene weibliche und männliche Wistarratten eingesetzt. Zur Gewinnung der Placenta dienten trächtige Tiere eigener Zucht [15 - 20 Tage nach Belegen]. Das durchschnittliche Gewicht der Wistarratten lag bei 250 g.
Die Tiere erhielten Standardkost [Altrumin] und Trinkwasser ad libitum.

Inaktive Steroide und radioaktive Präparate

Die inaktiven Steroide waren Handelspräparate der Firma Schering, Berlin.
Oestradiol-4-^{14}C mit einer spezifischen Aktivität von 31,8mCi/mMol
Δ^4-Androsten-3,17-dion-4-^{14}C [34,8mCi/mMol], Glukose-1-T [527mCi/mMol], Laktat-2-T [308mCi/mMol] und Glycerin-2-T [71mCi/mMol] wurden von New England Nuclear Corporation bzw. vom Radiochemical Centre Amersham bezogen.
Oestradiol-17α-T [196mCi/mMol, 98,1mCi/mMol] wurde nach einem früher ausgearbeiteten Verfahren bei der Firma Schering [Berlin] hergestellt.[29]
Alle Steroide wurden dünnschichtchromatographisch auf chemische und radiochemische Reinheit geprüft.

Reagentien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Reagentien waren von p.a. Reinheitsgrad [E.Merck, Darmstadt]; organische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.
Folgende Cofaktoren wurden verwendet: NAD, NADH und NADP [Biochemica Boehringer, Mannheim].

Gewebe

Die Ratten wurden nach Narkotisieren mit Äther durch Genickschlag getötet; nach dem Ausbluten wurden die Lebern zur Gewinnung von Gewebeschnitten entnommen. Die Leberschnitte wurden nach der Methode von Deutsch hergestellt und in eiskalte Ringerphosphat-Pufferlösung [pH 7,4] übergeführt.
In einigen Versuchen wurden den Tieren außerdem die Nieren, das

Diaphragma, die Hoden, die Samenblase, die Prostata, die Ovarien, die Placenta und der Uterus entnommen. Die Nieren und die Placenta wurden mit der Rasierklinge in etwa 0,5 mm dünne Scheiben zerlegt; das Diaphragma wurde unzerkleinert eingesetzt. Die Samenblase, die Prostata und die Ovarien wurden mit der Schere zerkleinert; der Uterus der Länge nach aufgeschnitten. Die so gewonnenen Gewebestückchen wurden zur Inkubation verwendet. Die Testes wurden aus dem Bindegewebsmantel freipräpariert und mit der Rasierklinge zerkleinert, der so gewonnene Gewebebrei wurde zur Inkubation verwendet.

Zur Homogenat-Herstellung wurde 320 mg Lebergewebe in 12 ml Puffer homogenisiert mit dem Potter-Homogenisator; nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden 4 ml Homogenat pro Ansatz eingesetzt.

Zellfraktionierung

Die Gewebe wurden mit der Schere zerkleinert und in 0,25m Rohrzucker-Lösung im Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat [50 proz. Gew./Vol.] wurde in einer Servall-Zentrifuge RC-2 bei 15000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde einer nochmaligen Zentrifugation in einer Spinco-Zentrifuge L-50 bei 100 000 g 60 Minuten lang zentrifugiert und das Sediment mit Hilfe eines Glashomogenisators in 0,25m Rohrzucker-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde erneut bei 100 000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Waschvorgang ein zweites Mal durchgeführt. Das Sediment [Mikrosomen-Fraktion] wurde in 0,25m Rohrzucker-Lösung aufgenommen, so daß 1 ml der Lösung die Mikrosomen aus 1 g Gewebe enthielt.

Inkubationsbedingungen

Die in 0,1 ml Propylenglycol gelösten inaktiven und radioaktiven Steroide [oder die in Puffer gelösten anderen Substrate] wurden in 4 ml Ringerphosphat-Pufferlösung [pH 7,4] mit den eingesetzten Geweben bzw. den Zellteilfraktionen in Warburggefäßen unter Luftzutritt bei 37°C im Thermostaten für [wenn nicht anders angegeben] 30 Minuten geschüttelt. Die eingesetzte Gesamtlösung betrug 4,1 ml. [Leber, Niere, Diaphragma, Hoden, Samenblase 150 - 200 mg Gewebe pro Ansatz]. Der Uterus wurde im Ganzen ver-

wendet 150 ± 20 mg Gewebe pro Ansatz; zwei Ovarien pro Ansatz 90 ± 10 mg]. Die Zeit zwischen Entnahme der Gewebe und Versuchsbeginn betrug 10 - 15 Minuten.

Aufarbeitung der Versuchsansätze mit Gewebeschnitten

Nach 30 Minuten, wenn in der Legende nicht anders vermerkt, wurde die Reaktion durch sofortiges Einbringen der Warburggefäße in Eis-Wasser abgestoppt. Zur Gewinnung der freien Metabolite aus den eingesetzten Geweben wurde der Überstand abzentrifugiert, die Gewebe homogenisiert und 4 mal mit je 3 ml Äthanol extrahiert. Der Überstand wurde mit 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt.
Äthanolische Zellauszüge und Methylenchloridextrakte der jeweiligen Überstände wurden gesammelt und zusammen zur Trockene eingeengt. HTO wurde nach Alkalisieren der Überstände durch Gefrierdestillation gewonnen.

Aufarbeitung der Ansätze mit Mikrosomen

Nach Beendigung der Versuche wurden die Inkubationslösungen 3 mal mit je 5 ml Äther/Chloroform 3:1 extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und anschließend eingedampft.

Dünnschichtchromatographie

Die zur Trockene eingeengten Extrakte wurden chromatographisch auf 0,25 mm dicken, nicht aktivierten Kieselgel-HF-Platten [Merck AG, Darmstadt] aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden einmal aufsteigend in den Systemen Chloroform/Methanol 95:5 [v/v], Cyclohexan/Essigester 1:1 [v/v] [System C nach Lisboa] [30], wenn im Text nicht anders vermerkt, entwickelt. In einigen Fällen wurde eine eindimensionale Mehrfachchromatographie durch wiederholte Entwicklung in den Systemen durchgeführt. Zum anderen wurde zur Trennung der sterisch unterschiedlichen Androstandiole im offenen System - Verdunsten des Fließmittels vom freien Ende der Dünnschichtplatte - aufsteigend in den Laufmitteln Chloroform/Aceton 9:1 und Cyclohexan/Essigester 1:1 entwickelt. [Teilweise wurde anschließend die noch nasse Platte aus dem "offenen System" in ein "geschlossenes System" übergeführt und anschließend eine halbe Stunde aufsteigend chromatographiert].

Die Lagebestimmung von radioaktiven Metaboliten erfolgte neben der direkten Aktivitätsmessung mit dem "Dünnschicht-Scanner" durch gleichzeitig aufgetragene Referenzsubstanzen, die nach dem Entwickeln entweder durch UV-Licht sichtbar gemacht oder mit Antimontrichlorid/Eisessig [zu gleichen Gewichtsteilen] angefärbt wurden.

Isolierung und Identifizierung der Metabolite

Die Zerlegung der nach der Dünnschichtchromatographie noch Gemische darstellenden Substanzzonen wurden nach Elution durch Re-Chromatographie und durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erreicht. Zur Acetylierung wurde die getrocknete Substanz in 0,05 ml wasserfreiem Benzol gelöst, mit 0,05 ml wasserfreiem Pyridin, 0,05 ml Benzol und 0,1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die auf diese Weise erhaltenen radioaktiven Acetate wurden dünnschichtchromatographisch durch mitlaufende authentische Referenzsubstanzen identifiziert.

Zur weiteren Identifizierung wurde die Konstanz der spezifischen Aktivität [Ipm/mg] der Metabolite bei mehrmaligem Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln nach Zusetzen von 0,2-0,5 g Referenzsubstanz als "Träger" geprüft.
Zur Oxydation von Hydroxylgruppen zu Ketogruppen wurden die mit Aceton erschöpfend eluierten Steroide in je 0,3 ml Eisessig gelöst, mit 0,2 ml 2%igem Chromtrioxyd/Eisessig versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Oxydationsprodukt wurde in Methylenchlorid aufgenommen, auf Dünnschichtplatten chromatographiert und durch mitlaufende Referenzsubstanzen identifiziert.

Herstellung von [4B - ^{3}H]NADPH

0,038 µMol Glukose-1-T wurde in einer zusammengesetzten enzymatischen Reaktion mit 1,4 µMol ATP, 4γ Hexokinase, 4γ Glukose-6-phosphat-dehydrogenase und 0,7 mg $NADP^{+}$ in Tris/HCl-Puffer-Lösung [pH 7,4] bei 37°C unter Luftzutritt 15 Minuten lang im Schütteltherostaten inkubiert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion unterbrochen und zum gebildeten [4B - ^{3}H]NADPH 0,2 ml Mikrosomensuspension und 106 µMol/l Δ^{4}-Androsten-3,17-dion zu-

gegeben. Anschließend wurde nochmals zur Reduktion der 4,5-Doppelbindung und der Ketogruppen von Δ^4-Androsten-3,17-dion 15 Minuten lang inkubiert.

Herstellung von [4A - ^{3}H]NADPH

[4A - ^{3}H]NADPH wurde hergestellt aus [4B - ^{3}H]NADPH, indem in der oben beschriebenen Weise hergestelltes [4B - ^{3}H]NADPH oxydiert wurde durch 15 minütige Inkubation mit 4 µMol Pyruvat und 50γ Laktatdehydrogenase. Das gebildete ^{3}H-NADP$^+$ wurde erneut reduziert durch Zugabe von 0,4 µMol inaktiver Glukose zum Inkubationsmedium und anschließender nochmaliger 15 minütiger Inkubation. Bei diesem Vorgehen wurde das B-Tritium transformiert zur [4A - ^{3}H]NADPH-Form. Anschließend wurde die Reaktion unterbrochen und zum gebildeten [4A - ^{3}H]NADPH 0,2 ml Mikrosomensuspension und 106 µMol/l Δ^4-Androsten-3,17-dion zugegeben und nochmals zur Reduktion der 4,5-Doppelbindung und der Ketogruppen von Δ^4-Androsten-3,17-dion 15 Minuten lang inkubiert.
Die Gesamtlösung für alle Inkubationsansätze zur Stereospezifität betrug jeweils 4,1 ml.
Es ist nicht zu befürchten, daß die NADPH-generierenden Systeme die Reduktion der 4,5-Doppelbindung von Δ^4-Androsten-3,17-dion durch die mikrosomale 5α-Reduktase stören. Somit erübrigte sich die Isolierung der sterisch unterschiedlichen A- und B-Form von NADPH.

Messung der Radioaktivität

Die Dünnschichtchromatogramme wurden in der Regel direkt auf der unveränderten Dünnschichtplatte mit dem [31] "Dünnschicht-Scanner" LB 2571 der Firma Berthold ausgemessen. Um eine optimale Trennung eng benachbarter Maxima zu erzielen, muß - besonders beim Messen ^{14}C-markierter Substanzen - das Dünnschichtzählrohr mittels der Höheneinstellmechanik des "Dünnschicht-Scanners" möglichst dicht [auf etwa 0,5 mm] der Oberfläche der Dünnschichtplatte genähert werden. Die Kurven wurden planimetrisch ausgemessen.
Radioaktive Lösungen wurden in Toluol -oder Dioxan-Szintillationslösungen im Flüssig-Szintillationszähler "Tri Carb" der Firma Packard gemessen. Die Zählausbeute wurde durch einen internen Standard bestimmt.

C. Ergebnisse

C 1. Versuche zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten

C 1a. Sexualcharakteristika der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion und Identifizierung der freien Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite

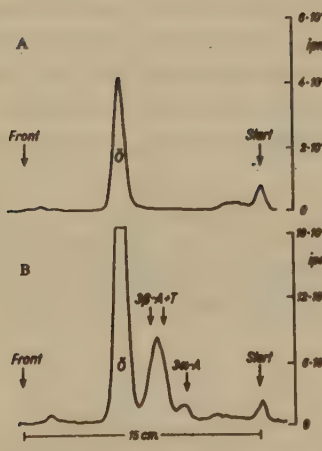


Abb.4

Dünnschichtchromatogramm eines Ansatzes zur Reduktion von Androstendion durch Oestradiol-17α-T in Leberschnitten männlicher Ratten.

Oe=Oestradiol, T=Testosteron, 3α-A=5β-Androstan-3α,17β-diol, 3β-A=5α-Androstan-3,17β-diol.

Oben: Ansatz ohne Androstendion-Zusatz

Unten: Ansatz mit Androstendion-Zusatz [170 µMol/l]

Inkubationsansatz: 150 - 200 mg Leberschnitte männlicher Ratten wurden in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer [pH 7,4] 30 Minuten lang bei 37°C im Warburg-Schüttelthermostaten unter Luftzutritt in Gegenwart von inaktiven Δ^4-Androsten-3,17-dion [170 µMol/l] unter Zusatz von Oestradiol-17α-T [51 µMol/l] inkubiert. Das anschließend abzentrifugierte Gewebe wurde homogenisiert und 4 mal mit je 3 ml Äthanol extrahiert. Der eingeengte Extrakt wurde auf Kieselgel-HF-Platten aufsteigend im System Cyclohexan/Essigester 1:1 chromatographiert.

Nach Inkubationen von Oestradiol-17α-T mit Leberschnitten männlicher Ratten wurden nur in Gegenwart von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion nach Dünnschichtchromatographie neben dem eingesetzten Oestradiol mehrere Tritium-markierte Substanzen nachgewiesen, wie Abb.4 zeigt. Die kleine Menge an der Startlinie verbleibender "hochpolarer" Metabolite wurde nicht identifiziert.

Drei Substanzen [siehe Substanz S-1 bis S-3 in Tab.1] wurden näher untersucht.
Die Charakterisierung erfolgte in zwei dünnschichtchromatographischen Systemen [Cyclohexan/Essigester 1:1 und Chloroform/Methanol 9:1] auf nicht aktivierten Kieselgel-HF-Platten und durch eine spezifische Farbreaktion mit Antimontrichlorid zum Nachweis funktioneller Gruppen. Außerdem wurde die Absorption im auffallenden UV-Licht herangezogen.

Nachgewiesene Verbindung	Chromatographie im System R_F-Werte I	II	Farbe mit $SbCl_3$	UV-Absorption	identifiziert als	nach Acetylieren R_F-Wert identisch mit	nach Oxydation R_F-Wert identisch mit
♂ S-1	0,20	0,44	blau	keine	5ß-Androstan-3α,17ß-diol	5ß-Androstan-3α,17ß-diacetat	5ß-Androstan-3,17-dion
♂ S-2	0,33	0,44	blau	keine	5α-Androstan-3,17ß-diol	5α-Androstan-3,17ß-diacetat	5α-Androstan-3,17-dion
♂ S-3	0,37	0,55	blau	positiv	Testosteron	Testosteron-acetat	Androstendion
♀ S-4	0,50	0,44	blau	keine	5α-Androstan-3α,17ß-diol	5α-Androstan-3α,17ß-diacetat	5α-Androstan-3,17-dion

Tab.1 Charakterisierung der nach Inkubation von Oestradiol-17α-T in Gegenwart von inaktiven Δ^4-Androsten-3,17-dion mit Leberschnitten weiblicher und männlicher Ratten nachgewiesenen Verbindungen. Einzelheiten vergleiche Bemerkungen in Abb.4 und Methodik Seite 7 und 8.
Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF.
System I: Cyclohexan/Essigester 1:1
System II: Chloroform/Methanol 9:1

S-1=3α-A, S-2=3ß-A, S-3=T in Abb.4
S-4= T-Androstandiol in Abb.5

Zur weiteren Identifizierung wurde der UV-absorbierende Substanzgipfel mit dem R_F-Wert von authentischem Testosteron vom ungefärbten Chromatogramm eluiert, acetyliert und das Acetatgemisch dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die acetylierten Substanzen wurden in zwei Subfraktionen zerlegt, die gleiche R_F-Werte wie authentisches Testosteronacetat und 5α-Androstan-3,17ß-diacetat zeigten.
Der unter der Testosteronbande liegende kleine Substanzgipfel [siehe 3α-A in Abb.4] war nach dem Acetylieren identisch mit

dem R_F-Wert von authentischem 5ß-Androstan-3α,17ß-diacetat. Außerdem wurden die isolierten Substanzen mit Chromtrioxyd in Eisessig oxydiert. Die Oxydationsprodukte entsprachen nach Dünnschichtchromatographie in Cyclohexan/Essigester 1:1 in ihrer Lage dem UV-absorbierenden Androstendion und der UV-inaktiven 5α- und 5ß-Androstandion-Derivate.

Lösungsmittel	Anzahl der Kristallisationen	Spezifische Aktivität in Ipm / mg		
		Testosteron	5α-Androstan-3α, 17 ß - diol	5α-Androstan-3, 17 ß - diol
Äthanol	1.	395	733	508
	2.	395	721	510
	3.	-	748	-
Methanol	1.	387	716	518
	2.	406	728	484
	3.	388	-	-
Chloroform	1.	410	708	480

Tab.2 Identifizierung der aus Alkoholextrakten und von Inkubationen mit Leberschnitten weiblicher und männlicher Ratten isolierten Androstendion-Reduktionsprodukte nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung. Zu jeder der aufgeführten Tritium-markierten Verbindung wurde 0,5 g authentischer, nicht markierter Substanz zugesetzt, aus drei verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert und die spezifische Aktivität bestimmt.

Zur weiteren Identifizierung wurde die Änderung der spezifischen Aktivität der Metaboliten bei mehrmaligem Umkristallisieren aus drei verschiedenen Lösungsmitteln geprüft. Die spezifische Aktivität blieb für die geprüften Metabolite [Testosteron, 5α-Androstan-3, 17ß-diol] konstant, was als Identitätsbeweis gilt [Tab.2].

Wie aus Abb.5 hervorgeht, wurde nach Inkubation unter gleichen Bedingungen mit Leberschnitten weiblicher Ratten neben dem eingesetzten Oestradiol nur eine tritierte Substanz [siehe S-4 in Tab.1] nachgewiesen. Die Substanz konnte als 5α-Androstan-3α,17ß-diol identifiziert werden. Tritium-markiertes Testosteron war unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

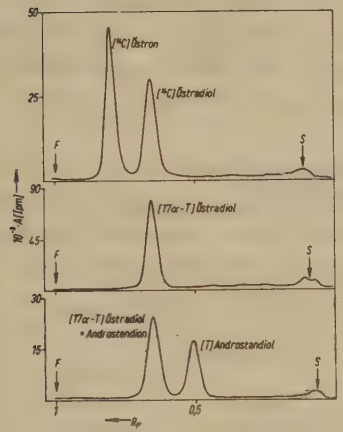


Abb.5

Radio-Dünnschichtchromatogramm der Metabolite von Δ^4-Androsten-3,17-dion und Oestradiol nach Inkubationen mit weiblichen Rattenleberschnitten.

Oben : Kontrollversuch mit Oestradiol-4-^{14}C [15µMol/l] mit Zusatz von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion [86µMol/l]

Mitte: Kontrollversuch mit Oestradiol-17α-T [2,4µMol/l] ohne Zusatz von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion

Unten: Inkubationsansatz mit Oestradiol-17α-T [2,4µMol/l] und inaktiven Δ^4-Androsten-3,17-dion [86µMol/l]

Einzelheiten der Inkubationsbedingungen siehe Text der Legende von Abb.4 und Methodik Seite 5,6 und 7.
Laufmittel: Cyclohexan/Essigester 1:1
Laufstrecke: 17 cm

Die Identifizierungsmaßnahmen entsprachen den oben angeführten und sind in den Tab.1 und 2 zusammengefaßt.
Um eine direkte Umwandlung von Oestradiol in Androgene auszuschließen, wurden Inkubationsversuche 1. mit Oestradiol-17α-T ohne Zusatz von inaktivem Androstendion und 2. mit Oestradiol-4-^{14}C durchgeführt. Die Abb.5 zeigt, daß in weiblichen Leberzellen ohne Δ^4-Androsten-3,17-dion-Zusatz neben dem eingesetzten Tritium-markierten Oestradiol keine radioaktiv-markierten Substanzgipfel in dem fraglichen R_F-Bereich der Androgene nachweisbar waren.
Aus Oestradiol-4-^{14}C entstand neben einem nicht identifizierten hochpolaren Startgipfel Oestron als Haupt-Metabolit. Folglich sind die gefundenen Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite durch Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf

Δ^4-Androsten-3,17-dion entstanden.

C 1b. Untersuchungen über den Ort des Tritium-Einbaus im Steroidgerüst bei der Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion

Die Oxydation der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite durch Chromtrioxyd/Eisessig gibt Aufschluß über den Ort des Tritium-Einbaus in das Androgengerüst. Tritium, das zur Reduktion von Keto- zu Hydroxy-Gruppen herangezogen wurde, wird bei der Oxydation als Tritium-markiertes Oxydationswasser [HTO] abgespalten. Im Gegensatz dazu wird in die 4- oder 5-Position in Ring A eingebautes Tritium - unter Reduktion der 4,5-Doppelbindung - bei der Oxydation nicht abgespalten. Es bleibt also im Androgengerüst fixiert.
Die in Tab.3 zusammengefaßten Ergebnisse der Oxydation der reduzierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite mit Chromtrioxyd in Eisessig zeigen, daß Tritium hauptsächlich zur Reduktion von Ketogruppen verwendet wurde. Der Einbau in die 4,5-Doppelbindung in Ring A des Steroidgerüstes ist zu vernachlässigen.

^{3}H-markierte Verbindungen	nach Oxydation ^{3}H-Einbau in % der eingesetzten Aktivität		Oxydationsprodukt
	HTO	Oxydationsprodukt	
Testosteron	100	0	Androstendion (inaktiv)
5α-Androstan-3,17β-diol	98	2	5α-Androstan-3,17-dion (inaktiv)
5α-Androstan-3α,17β-diol	97	3	5α-Androstan-3,17-dion (inaktiv)

Tab.3 Aufklärung der Stellung des eingebauten Tritiums im Steroidgerüst der Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion durch Oxydation. Einzelheiten siehe Methodik Seite 8.

C 1c. Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen NAD bzw. NADP-generierenden Systemen

Zur Prüfung der Frage, ob Oestradiol in der Leberzelle eine Aus-

nahmestellung in Bezug auf die NAD-T bzw. NADP-T-erzeugenden Systeme einnimmt, wurden Inkubationen mit verschiedenen Tritium-markierten Substraten durchgeführt.
Die Tritium-Einbauraten bei Inkubationen mit Leberzellen männlicher Ratten in Gegenwart von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion in die Androgengesamtfraktion und in HTO durch Laktat-2-T und Glycerin-2-T als NAD-T-Lieferanten und durch Glukose-1-T und Glutamat-2-T als NADP-T-Lieferanten sind in Tab.4 zusammengestellt.
Nach Chromatographie des Alkoholextraktes der Leberschnitte konnte mit dem "Dünnschicht-Scanner" keine Radioaktivität im Bereich des R_F-Wertes der Androgenfraktion nachgewiesen werden.

Eingesetztes Substrat	Androstendion-Zusatz [170µMol/l]	Konzentration [µMol/l]	Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität in HTO	Testosteron + 5α-Androstan-3.17ß-diol
Leberschnitte männlicher Ratten				
1. Oestradiol-17α-T		51	4,3	5,7
2. Oestradiol-17α-T ohne Androstendion		51	8,8	$< 10^{-2}$
3. Laktat-2-T		31	26,0	$5,1 \cdot 10^{-3}$
4. Glycerin-2-T		140	50,0	$5,4 \cdot 10^{-3}$
5. Glucose-1-T		17,9	83,0	$2,2 \cdot 10^{-3}$
6. Glutamat-2-T		12,4	88,0	$15 \cdot 10^{-3}$

Tab.4 Vergleich des Tritium-Einbaus in Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion zwischen verschiedenen Tritium-markierten Substraten.
Einzelheiten der Inkubationsbedingungen siehe Text der Legende zu Abb.4 und Methodik Seite 6,7 und 8.

Um auch geringste Einbauraten des Tritiums zu erfassen, wurde das Kieselgel fraktionsweise von der Dünnschichtplatte abgeschabt, mit Aceton eluiert und die Radioaktivität im Flüssig-

Szintillationszähler "Tri Carb" gemessen. Dabei zeigte sich im Bereich der Androgenfraktion ein Tritium-Einbau von etwa 1/100% der eingesetzten Aktivität. Radioaktivitätsmessungen der Gefrierdestillate der alkalisierten Inkubationsmedien bewiesen andererseits, daß die eingesetzten Substrate zu einem hohen Prozentsatz zu HTO abgebaut wurden, also daß intermediär NAD-T bzw. NADP-T gebildet wurde. Das bedeutet, daß Oestradiol als Wasserstoffdonator bei der Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion um den Faktor 1000 gegenüber den übrigen untersuchten NAD - NADP-generierenden Systemen bevorzugt wurde.

Versuchsbedingungen	Substrat-Konz. [µMol/l]	Androstendion-Konz. [µMol/l]	Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität: HTO	5α-3α	Testosteron	5α-3ß	5ß-3α
Leberschnitte							
♂, [17α-T]Oestradiol	28,5	86	8,3	-	5,2	4,8	1,7
♂, [17α-T]Oestradiol	2,4	86	26,4	-	8,2	12,2	3,9
♀, [17α-T]Oestradiol	2,4	86	28,5	26,4	-	-	-
Leberhomogenat							
♂, [2-T]Lactat	30	174	45,5		$< 0{,}4 \cdot 10^{-3}$		
♂, [1-T]Glucose	18	174	61,7		$1{,}2 \cdot 10^{-3}$		
♂, [2-T]Glycerin	140	174	48,5		$< 0{,}6 \cdot 10^{-3}$		
♂, [17α-T]Oestradiol	52,4	174	1,7		1,7		

Tab. 5 Oben : Sexualspezifität des Tritium-Einbaus von Oestradiol-17α-T in Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion in Leberschnitten.
Unten: Vergleich des Tritium-Einbaus aus verschiedenen NAD-T und NADP-T erzeugenden Substraten im Leberhomogenat.

Einzelheiten siehe zur Methodik den Text der Legende zu Abb. 4.

Tab. 5 enthält die Ergebnisse entsprechender Versuche mit Leberhomogenat zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T, Laktat-2-T, Glukose-1-T und Glycerin-2-T auf die Reduktionsprodukte von

Δ^4-Androsten-3,17-dion. Ausschließlich Oestradiol-17α-T bildete reduzierte Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite. Der Tritium-Einbau von Glycerin, Laktat und Glukose in Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion war auch hier zu vernachlässigen.

C 1d. Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität des Tritium-acceptors Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen Androgenen

Die Ergebnisse von Inkubationsversuchen mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten mit Oestradiol-17α-T als Tritiumspender in Gegenwart freier bzw. veresterter Ring-A-ungesättigter Androstenderivate und Ring-A-gesättigter Androstanderivate sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Tritium-Acceptor	Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität in							
	Testosteron		5α-Androstan-3α, 17β-diol		5α-Androstan-3β, 17β-diol		5β-Androstan-3α, 17β-diol	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Δ^4-Androstendion	1,2	15,8	27,9	---	---	17,2	---	6,1
Testosteron	0,6	4,8	14,1	---	---	8,3	---	2,7
Testosteron-acetat	0,3	2,7	10,2	---	---	6,2	---	2,1
Testosteron-propionat	0,2	1,5	8,2	---	---	4,7	---	1,3
Δ^5-Androsten-3, 17-diol	---	---	---	---	---	---	---	---
Δ^4-Androsten-3, 17-diol	0,2	1,3	24,7	---	---	12,3	---	4,1
5α-Androstandion	---	---	22,2	---	---	5,3	---	---
5β-Androstandion	---	---	---	---	---	---	0,45	0,1
5α-Androstan-3α-ol, 17-on	---		15,3	0,6	---	1,8	---	---
5α-Androstan-3β-ol, 17-on	---	---	0,9	---	11,6	4,9	---	---
5β-Androstan-3α-ol, 17-on	---	---	---	---	---	---	0,65	0,3
5β-Androstan-3β-ol, 17-on	---	---	---	---	---	---	---	---
5α-Androstan-3-on, 17-ol	---	---	7,3	---	---	3,7	---	---
5β-Androstan-3-on, 17-ol	---	---	---	---	---	---	0,8	0,6
5α-Androstan-3α, 17β-diol	---	---	---	---	---	3,9	---	---
5α-Androstan-3β, 17β-diol	---	---	7,3	---	---	---	---	---
5β-Androstan-3α, 17β-diol	---	---	---	---	---	---	---	---

Tab.6 Abhängigkeit der Androgenreduktion durch Oestradiol von der Androgenkonfiguration. Zur Methodik vergleiche Text der Legende Abb.4.
Versuche mit Leberschnitten von Rattenweibchen.
Androgenkonzentration : 100 µMol/l
Oestradiol-17α-T : 36 µMol/l [15,2 µCi]
--- nicht nachweisbar.

Mit Ausnahme von Δ^5-Androsten-3,17-diol bilden ausschließlich Ring-A-ungesättigte Verbindungen Testosteron. Wird z.B. Testosteron als Tritiumacceptor eingesetzt, also eine schon in 17-Position zur Hydroxylgruppe reduzierte Verbindung, entsteht ebenfalls tritiertes Testosteron. Das bedeutet, da Δ^4-Androsten-3,17-dion Ausgangsprodukt für die Testosteron-Bildung ist, daß das eingesetzte Testosteron erst intermediär zum Δ^4-Androsten-3,17-dion oxydiert wurde. Die Testosteron-Ausbeute ist geschlechtsspezifisch. Die relative Ausbeute an tritiertem Testosteron ist - unter den gegebenen Versuchsbedingungen - in Leberzellen männlicher Ratten ungefähr 10 - 15 mal größer als in Leberzellen von weiblichen Ratten.

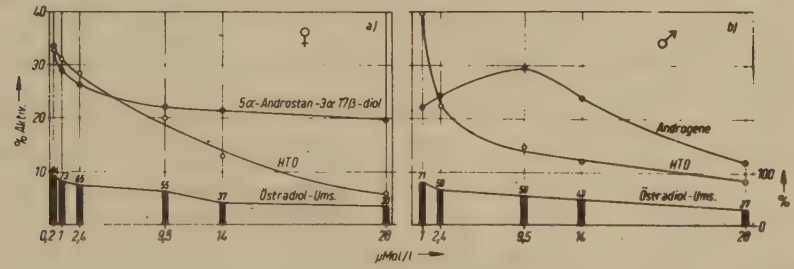
Bei der Bildung von Androstandiolen ist der Sachverhalt komplizierter. Werden Androsten-Derivate eingesetzt, werden ausschließlich die für das Geschlecht charakteristischen Androstandiole gebildet. Sind dagegen schon Ring-A-gesättigte Androstan-Derivate Tritiumacceptoren, verwischt sich das sexualspezifische Androstandiol-Muster. Wird z.B. 5α-Androstandion eingesetzt, entstehen in Leberzellen weiblicher und männlicher Ratten sowohl die sexualspezifischen als auch teilweise die geschlechtsentgegengesetzten Androstandiole. Ist 5α-Androstan-3ß-ol,17-on Tritiumacceptor, kann in Leberzellen weiblicher Ratten Tritium-markiertes 5α-Androstan-3,17ß-diol nachgewiesen werden. Außerdem wird interessanterweise die für Leberzellen weiblicher Ratten sexualspezifische 3α,5α-Verbindung gebildet, was eine intermediäre Bildung einer 3-Ketogruppe mit anschließender sterischer Umwandlung bei der Rückreduktion voraussetzt. Ein analoger Vorgang muß angenommen werden für Leberzellen männlicher Ratten, wenn 5α-Androstan-3α-ol,17-on als Tritiumacceptor eingesetzt wird.

Setzt man vollständig hydrierte Androstandiole als Tritiumacceptoren ein, also Substanzen, die keine reduzierbaren Gruppen haben, liegt die Vermutung nahe, daß eine Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T ausgeschlossen ist. Die Ergebnisse zeigen aber, daß 5α-Androstandiole, die für das jeweilige Geschlecht nicht charakteristisch sind, an der Hydroxylgruppe an C-3 sterisch umgewandelt werden unter Bildung von geschlechtsspezifischen Androstandiolen, wobei diese Tritium-markiert sind. Die eingesetzten Androstandiole müssen also intermediär zu Ketonen oxydiert worden sein, die dann sekundär reduziert werden.
Bemerkenswert ist ferner, daß die biologisch inaktiven 5ß-konfi-

gurierten Androstan-Derivate das vom Oestradiol-17α-T stammende Tritium nur in geringem Ausmaß übernehmen.

C 1e. Einfluß der Oestradiol-17α-T-Konzentration auf die Tritium-Übertragung auf Δ^4-Androsten-3,17-dion

Abb.6a gibt für Leber weiblicher Ratten den Einfluß der Oestradiol-17α-T-Konzentration auf den Tritium-Einbau in reduzierte Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite, in HTO und auf den Oestradiol-Umsatz wieder. Die in Abb.6b angegebenen Ergebnisse für Leber männlicher Ratten wurden unter den gleichen Bedingungen gewonnen wie die unter der Abb.6a zusammengefaßten Befunde, so daß ein direkter Vergleich der Einbauraten für Tritium in Androgene und in HTO möglich ist.



Abhängigkeit des Tritium-Einbaus in Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion und in Wasser [HTO] von der Oestradiol-17α-T-Konzentration [Abszisse].
Oestradiol-Umsatz: Differenz aus eingesetzter und wiedergefundener Menge

Abb.6a: Inkubationsansätze mit Oestradiol-17α-T [0,2 - 28 µMol/l] und inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion [86 µMol/l] und Leberschnitte weiblicher Ratten.

Abb.6b: Analoge Versuchsansätze mit Lebersohnitten männlicher Ratten.

Linke Ordinate : Tritium-Einbau in % der eingesetzten Oestradiol-17α-T-Aktivität
Rechte Ordinate: Umsatz von Oestradiol in % [=schwarze Balken].

Zur Methodik vergleiche Text der Legende Abb.4

Aus den Abb.6 geht hervor, daß in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten das vom Oestradiol stammende Tritium mit abnehmender Oestradiol-Konzentration relativ immer stärker zur

Androgenreduktion verwendet wurde. Allerdings wurde gleichzeitig - unabhängig vom Geschlecht - auch relativ mehr Tritium zu HTO "verbrannt". Das bei männlicher Rattenleber auftretende Maximum der Ausbeute bei der Summe der Tritium-markierten Androgene kann durch sekundäre Oxydation von primär gebildetem Testosteron-17α-T erklärt werden.

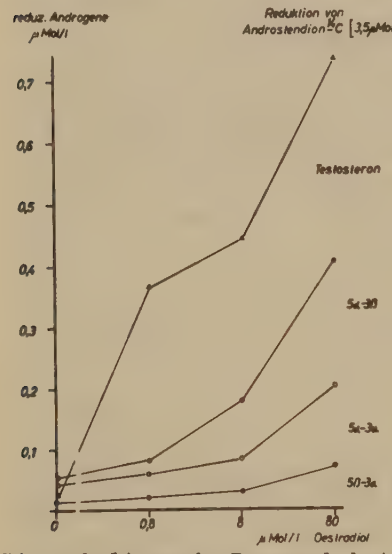


Abb. 7

Abhängigkeit der Bildung von Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktionsprodukten in weiblicher und männlicher Rattenleber von der Oestradiol-Konzentration.

Ordinate: Konzentration der gebildeten Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion [5α-3ß=5α-Androstan-3,17ß-diol, 5α-3α=5α-Androstan-3α,17ß-diol, 5ß-3α=5ß-Androstan-3α,17ß-diol].

Abszisse: Oestradiol-Konzentration

Inkubationsbedingungen siehe Text der Legende zu Abb. 4

Die naheliegende Frage, ob bei konstanter Menge Δ^4-Androsten-3,17-dion eine steigende Oestradiol-Konzentration zu einer Steigerung der Androgenreduktion im stöchiometrischen Verhältnis führt, läßt sich verneinen. Lediglich ist aus den Ergebnissen ableitbar, daß mit steigenden Mengen Oestradiol mehr Δ^4-Androsten-3,17-dion reduziert wurde [Abb. 7]. Außerdem war für die Interpretation der Versuchsergebnisse dieser Arbeit der Vergleich der Ausbeuten an reduziertem Androgen bei An- und Abwesenheit von Oestradiol besonders wichtig. So zeigte sich [Abb. 7] bei den Androstandiolen, daß bei Oestradiol-Konzentrationen von 0-8 µMol/l nur ein Anstieg der Androstandiol-Anteile um das dreifache erfolgte, während die Reduktion zum Testosteron auf das 10fache anstieg.
Außerdem ist aus der Abb. 7 zu entnehmen, daß in männlicher Leber mehr 5α- als 5ß-Androstandiole gebildet wurden. Das Verhältnis betrug bei Oestradiol-Konzentrationen bis 8 µMol/l ungefähr 3:1,

bei höheren Substratmengen verschob sich das Verhältnis stärker zugunsten der 5α-Verbindung.
Die Befunde über den Einfluß der Oestradiol-17α-T-Konzentration auf die Ausbeute Tritium-markierter Androgene in Gegenwart einer konstanten Menge Δ^4-Androsten-3,17-dion deuten an, daß in der Leber von Ratten zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion wechselseitige oxydo-reduktive Beziehungen bestehen. Oxydo-Reduktionen beim Oestradiol wirken sich aus auf Oxydo-Reduktionen beim Δ^4-Androsten-3,17-dion. Diese Annahme läßt vermuten, daß - in Umkehrung der oben beschriebenen Versuche [Abb.7] - eine steigende Konzentration von Δ^4-Androsten-3,17-dion in Gegenwart einer konstanten Menge Oestradiols zu einer vermehrten Bildung von Oestron führt.

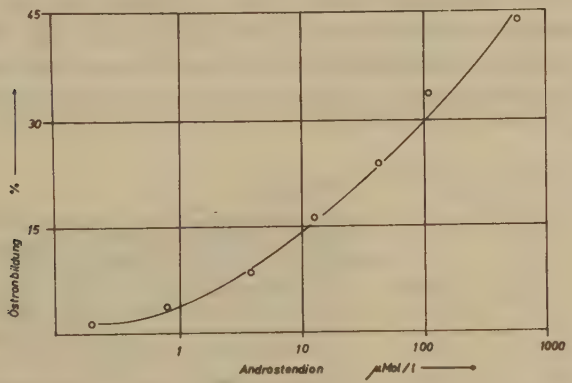


Abb.7a Oxydation von Oestradiol zu Oestron in Leberschnitten weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration.
Leberschnitte wurden mit 0,41 µCi Oestradiol-4-^{14}C [1,88 µMol/l] und steigenden Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentrationen inkubiert in Ringer-Phosphat-Puffer [pH 7,4] unter Luftzutritt bei 37°C 15 Minuten lang.
Der Oestron-4-^{14}C-Anteil in % der eingesetzten Gesamtmenge von Oestradiol-4-^{14}C wurde nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im System Cyclohexan/Essigester 1:1 bestimmt.

Wie Abb.7a zeigt, wird in Leberschnitten weiblicher Ratten tatsächlich aus Oestradiol-4-^{14}C mit steigendem Zusatz von Δ^4-Androsten-3,17-dion vermehrt Oestron-4-^{14}C gebildet.

C 1f. Anteil des Oestradiol-Wasserstoffs bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion zu Testosteron und Ring A-gesättigten Androstandiolen in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten

In einer weiteren Versuchsreihe sollten die spezifischen Aktivitäten der reduzierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite [nach Oestradiol-17α-T-Gabe] Aufschluß geben über den vom Oestradiol stammenden Anteil der Reduktionsäquivalente im Verhältnis zur Gesamtreduktion. Die spezifischen Aktivitäten der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Derivate wurden dargestellt in % der spezifischen Aktivität des Tritium-Donators Oestradiol-17α-T. Um die Reduktionsprodukte quantitativ zu bestimmen, wurde ^{14}C-markiertes Δ^4-Androsten-3,17-dion mit bekannter molspezifischer Aktivität eingesetzt. Bei den doppeltmarkierten Proben ergab dann der ^{14}C-Gehalt die Menge in µMol und der Tritium-Gehalt die molspezifische Aktivität des Tritium-Gehaltes. Dieser wurde auf die molspezifische Aktivität des eingesetzten Oestradiols-17α-T [=100%] bezogen.

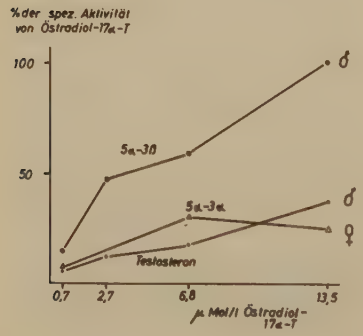


Abb.8

Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der Tritium-markierten Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion in weiblichen und männlichen Rattenleberschnitten von der Oestradiol-17α-T-Konzentration.

Androstendion-4-^{14}C-Konzentration: 3,5µMol/l

5α-3β bzw. 5α-3α siehe Erklärung Legende zu Abb.7.

Einzelheiten der Inkubationsbedingungen vergleiche Text der Legende zu Abb.4.

Nach den in Abb.8 wiedergegebenen Ergebnissen erreichte die spezifische Aktivität des in weiblicher Rattenleber gebildeten 5α-Androstan-3α,17β-diols nur etwa 10 bis 30% des Wertes der eingesetzten Gesamtaktivität von Oestradiol-17α-T. Die Abhängigkeit von der Oestradiol-Konzentration war nur gering. In der Leber von Männchen erreichte dagegen bei Oestradiol-Überschuß

die spezifische Aktivität des 5α-Androstan-3,17ß-diols bis zu 100% der spezifischen Aktivität von Oestradiol [siehe Diskussionsbeitrag auf Seite 56].
Wie ein gesonderter Versuch zeigte, erreichte die spezifische Aktivität der reduzierten Androgene selbst bei der geringen Oestradiol-Konzentration von 0,3µMol/l und einer Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration von 0,7µMol/l noch Werte von 20 bis 25% der spezifischen Aktivität des eingesetzten Oestradiols.

C 2. Untersuchungen zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Niere, Diaphragma und Sexualorganen männlicher Ratten

Die Ergebnisse vergleichender Untersuchungen zur Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf inaktives Δ^4-Androsten-3,17-dion in Niere, Diaphragma und Sexualorganen von männlichen Ratten sind in Tab.7 zusammengefaßt. Die Hoden ausgewachsener männ-

			Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität					
Gewebe	Oestradiol [µMol/l]	Androstendion [µMol/l]	HTO	Testosteron	5α-3α	5α-3ß	5ß-3α	unidentifizierte Steroide
Leber männl.	2,4	86,0	22,3	8,2	-	12,2	3,9	-
Leber weibl.	2,4	86,0	28,5	-	26,4	-	-	-
Niere	51,0	172,0	0,8	-	-	-	-	-
Diaphragma	51,0	172,0	0,4	-	-	-	-	-
Prostata	6,6	86,0	0,8	-	-	-	-	-
Samenblase	6,6	86,0	0,2	-	-	-	-	-
Hoden	51,0	172,0	0,5	-	-	-	-	-

Tab.7 Gewebsspezifität bei der Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion durch Oestradiol-17α-T.
Inkubationsbedingungen siehe Text von Legende der Abb.4.

licher Ratten als primäre Synthesestätten für Androgene und die Zielorgane der Androgenwirkung, Samenblase und Prostata, bildeten keine durch Oestradiol reduzierten Androgene.
Ferner waren bei den für die primäre Sexual-Hormonwirkung unspezifischen Geweben wie Niere und Zwerchfellmuskel keine tritierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite nachweisbar.

C 3. Untersuchungen zur Gewebsspezifität der Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in Placenta, Ovarien, Uterus und Leber von trächtigen Ratten

C 3a Identifizierung der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite

Nach Inkubation von Oestradiol-17α-T mit Gewebeschnitten von Placenta und Ovar tragender Ratten in Gegenwart von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion wurden nach erster dünnschichtchromatographischer Auftrennung der freien Metabolite im System Chloroform/Methanol 9:1 zwei radioaktive Fraktionen nachgewiesen.

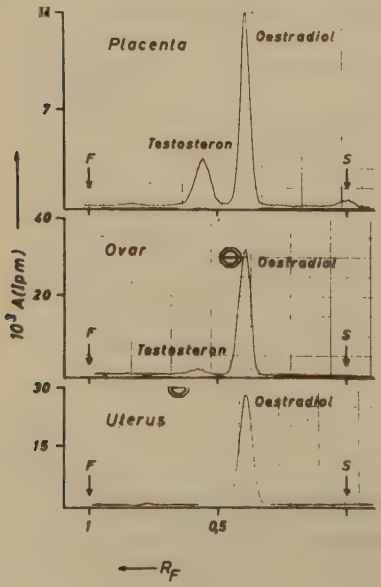


Abb.9

Radio-Dünnschichtchromatogramm freier Metabolite aus Inkubationsansätzen mit Oestradiol-17α-T [5,5µMol/l] und inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion [86µMol/l] zur Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion in Placenta, Ovar und Uterus von trächtigen Ratten.

Inkubationsbedingungen: 100 - 150 mg Gewebeschnitte wurden in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer [pH 7,4] 30 Minuten lang bei 37°C aerob geschüttelt. Das anschließend abzentrifugierte Gewebe wurde homogenisiert und 4 mal mit je 3 ml Äthanol extrahiert. Die Extrakte wurden zur Trockene eingeengt und auf Kieselgel HF-Platten aufsteigend entwickelt.

Laufmittel: Chloroform/Methanol 9 : 1

Laufstrecke: 17 cm.

Die R_F-Werte zeigten Übereinstimmung mit denjenigen von authentischem Testosteron und Oestradiol.
Die Aufarbeitung eines unter gleichen Bedingungen durchgeführten Inkubationsansatzes mit Uterus ergab nur eine "polare" Fraktion, deren R_F-Wert dem von authentischem Oestradiol entsprach [Abb.9].
Bei der Rechromatographie der einzelnen Fraktionen im System Cyclohexan/Essigester 1:1 wurde die "Testosteron"-Fraktion auf Grund ihres R_F-Wertes, der intensiven Blaufärbung beim spezifischen Nachweis mit Antimontrichlorid und der positiven UV-Absorption als Testosteron identifiziert. Ferner wurde die Verbindung vom ungefärbten Chromatogramm eluiert, acetyliert und das Acetat im System Cyclohexan/Essigester 1:1 chromatographiert.

Lösungsmittel	Anzahl der Kristallisationen	Spezifische Aktivität in Ipm / mg Testosteron	Testosteronacetat
Äthanol	1.	1539	428
	2.	1570	407
Methanol	1.	1470	448
	2.	1488	439
Chloroform	1.	1469	-
	2.	1520	-
Essigester	1.	-	412
	2.	-	402

Tab.8 Identifizierung des aus Alkoholextrakten von Inkubationen mit Placenta und Ovar isolierten Testosterons und der acetylierten Verbindung nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung.
Einzelheiten siehe Legende Tab.2 und Methodik Seite 8.

Die acetylierte Verbindung zeigte gleichen R_F-Wert wie authentisches Testosteronacetat. Außerdem wurde das Verhalten der spe-

zifischen Aktivität des freien Metaboliten und der acetylierten Verbindung bei mehrmaligem Umkristallisieren aus drei verschiedenen Lösungsmitteln nach Zusatz von authentischer Substanz [Testosteron,Testosteronacetat] geprüft.Die spezifische Aktivität blieb konstant,was als Identitätsbeweis gilt [Tab.8].

Um eine direkte Bildung von Testosteron aus Oestradiol in Placenta und Ovar auszuschließen,wurden Inkubationen mit Oestradiol-17α-T ohne Zusatz von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion durchgeführt.Ein radioaktiver Substanzgipfel im R_F-Bereich von authentischem Testosteron war nicht nachweisbar.Außerdem konnte durch Inkubation mit Δ^4-Androsten-3,17-dion-4-^{14}C dessen Reduktion zu Testosteron in Placenta und Ovar bestätigt werden.Für Placenta sind die Ergebnisse in Abb.10 dargestellt.

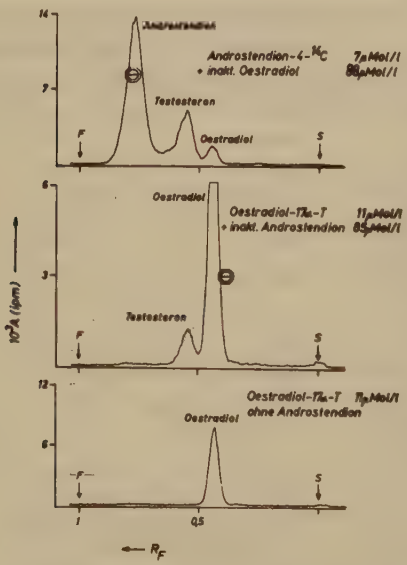


Abb.10

Radio-Dünnschicht-Chromatogramm der freien Metabolite von Δ^4-Androsten-3,17-dion und Oestradiol aus Inkubationsansätzen mit Placenta von trächtigen Ratten.

Konzentrationsangaben in der Abb.

Laufmittel: Chloroform/ Methanol 9:1

Einzelheiten der Inkubationsbedingungen siehe Text der Legende zu Abb.9.

Die noch ein Gemisch darstellende "Oestradiol-Zone" wurde nach Rechromatographie im System Cyclohexan/Essigester 1:1 in zwei Einzelkomponenten zerlegt.Neben dem eingesetzten Oestradiol-17α-T, das nicht vollständig umgesetzt wurde,konnten in allen Ansätzen mit Placenta und Ovarien höher polare Fraktionen nachgewiesen

werden.Diese "hoch-polaren" Substanzzonen wurden nicht näher identifiziert,deuten aber auf das Vorhandensein stärker hydroxylierter Verbindungen hin.Im wachsenden Uterus von trächtigen Ratten konnte eine Metabolisierung von Oestradiol nicht nachgewiesen werden.

Das Ausmaß der Bildung Tritium-markierter Steroide bei Inkubation mit Placenta,Ovar,Uterus und Leber von trächtigen Ratten ist in Tab.9 zusammengefaßt.Der auffälligste Unterschied zwischen den untersuchten Organen besteht im Fehlen eines Tritium-haltigen Reduktionsproduktes von Δ^4-Androsten-3,17-dion [Tes-

Gewebe [♀]	Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität in: HTO	Testosteron	5α-Androstan-3α, 17β-diol	unidentifizierte Steroide R_F-Werte im System I: 0,0	0,16
Mit Androstendion					
Leber	18,9	-	36,9	-	-
Uterus	0,4	-	-	-	-
Ovar	2,2	6,4	-	-	21,4
Placenta	16,3	20,2	-	-	15,6
Ohne Androstendion					
Leber	36,6	-	-	18	-
Uterus	1,0	-	-	-	-
Ovar	3,6	-	-	-	2,7
Placenta	7,9	-	-	-	1,8

Tab.9 Tritium-Einbau in verschiedene Substanzen nach Inkubation von Gewebeschnitten trächtiger Ratten mit Oestradiol-17α-T

Inkubation: 37°C, 30 Minuten, pH = 7,4

Oestradiol-17α-T: 5,5µMol/l
Δ^4-Androsten-3,17-dion: 86,0µMol/l

Chromatographie in Cyclohexan/Essigester 1:1
Einzelheiten siehe Methodik Seite 6,7 und 8.
Die Werte sind das Mittel von Doppelbestimmungen.

tosteron oder Androstan-Derivate] bei Versuchen mit Uterusgewebe, während in allen anderen untersuchten Geweben derartige Reduktionsprodukte nachweisbar sind. Weiterhin ergab sich eine unterschiedliche Ausbeute an Tritium-markiertem Testosteron in Placenta und Ovar [3:1]. Außerdem ist das Ausmaß der Bildung von tritiertem Wasser [HTO] in den untersuchten Organen verschieden. In Placenta - und besonders in der Leber - war die HTO-Ausbeute erheblich größer als in Ovar und Uterus [bezogen auf mg Trockengewicht]. Fehlt Δ^4-Androsten-3,17-dion, so wird die HTO-Ausbeute in Placenta um die Hälfte vermindert und natürlich kein Tritium-markiertes Testosteron gebildet. Bei Uterus und Ovar steigt dagegen die HTO-Ausbeute. Die erhöhte HTO-Ausbeute in Placenta bei Anwesenheit von Δ^4-Androsten-3,17-dion spricht für eine teilweise HTO-Bildung durch Oxydation von primär durch Tritium-Übertragung gebildetem Testosteron-17α-T. Möglicherweise sind die Verhältnisse in der Placenta ähnlich den Verhältnissen im Lebergewebe, wo man von konkurrierenden Reaktionswegen des vom Oestradiol-17α-T stammenden Tritiums in Richtung Δ^4-Androsten-3,17-dion [Bildung von 5α-Androstan-3α,17ß-diol] und Richtung Atmungskette [Bildung von HTO] sprechen kann.

C 3b. Der Einfluß der Steroid-Konzentration auf die Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in der Placenta

Der Einfluß der Konzentration an Oestradiol-17α-T auf den Tritium-Einbau in Testosteron und in Oxydationswasser in Gegenwart von Δ^4-Androsten-3,17-dion und bei Androstendionfreien Inkubationsansätzen ist für Placenta in Abb. 11 dargestellt. Ähnlich wie bei entsprechenden Versuchen mit Leberschnitten steigt mit abnehmender Oestradiol-Konzentration relativ die HTO-Bildung und der Tritium-Einbau in Testosteron an. Die HTO-Ausbeute ist bei allen geprüften Oestradiol-Konzentrationen in Gegenwart von Δ^4-Androsten-3,17-dion deutlich größer als bei Androstendion-freien Ansätzen. Vermutlich wird ein Teil des HTO durch sekundäre Oxydation des primär entstandenen Testosterons-17α-T gebildet, wie bereits oben erwähnt. Außerdem zeigt Abb. 11,

daß mit steigendem Oestradiol-Angebot immer mehr freies Oestradiol übrig bleibt, also der relative Oestradiol-Umsatz sinkt.

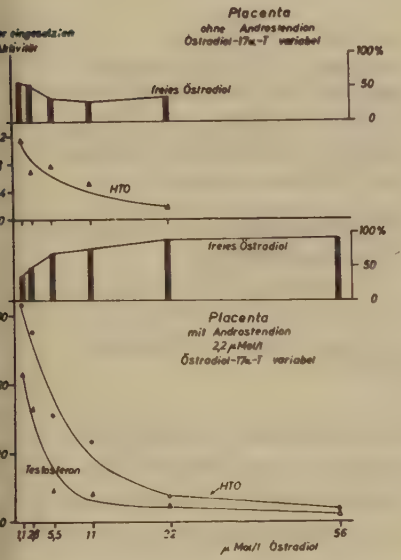


Abb. 11

Tritium-Einbau in Wasser [oben] bzw. in Wasser und Testosteron [unten] in Placentaschnitten in Abhängigkeit von der Oestradiol-Konzentration.

Oben : Ohne Δ^4-Androsten-3,17-dion-Zusatz

Unten: Mit Δ^4-Androsten-3,17-dion [2,2µMol/l]

Die schwarzen Balken zeigen den Anteil in % an wiedergefundenem Oestradiol-17α-T.

Allerdings scheint dieser Effekt nur bei Anwesenheit von Δ^4-Androsten-3,17-dion aufzutreten. Beim Fehlen von Δ^4-Androsten-3,17-dion findet man entsprechend weniger freies Oestradiol-17α-T wieder.

Eine weitere Versuchsserie zeigt die Abhängigkeit des Δ^4-Androsten-3,17-dion-Umsatzes [Bildung von Testosteron durch Reduktion und von Oestradiol-17ß durch Aromatisierung] von der Oestradiol-Konzentration in Gewebeschnitten der Placenta. Als Substrate wurden dabei eingesetzt: Δ^4-Androsten-3,17-dion-4-^{14}C und inaktives Oestradiol-17ß. Wie man aus der Abb. 12 erkennen kann, nimmt die Bildung von Testosteron mit steigender Konzentration von Oestradiol zu. Maximal werden 7% der eingesetzten Menge Δ^4-Androsten-3,17-dion zu Testosteron reduziert.

Der Einfluß sehr geringer Oestradiol-Konzentration ist erstaunlich hoch: Die Ausbeute an Testosteron ist bei Anwesenheit von 5µMol/l Oestradiol etwa 15 mal größer als beim Fehlen von Oestradiol. Die aus Δ^4-Androsten-3,17-dion-4-^{14}C gebildete Oestradiol-

Menge [Aromatisierung] war dagegen unabhängig von der Oestradiol-Konzentration.

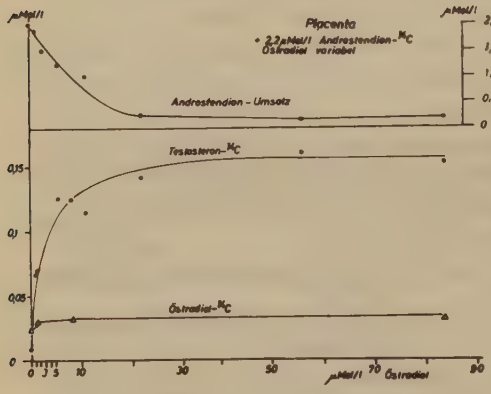


Abb.12

Bildung von Testosteron und Oestradiol aus Δ^4-Androsten-3,17-dion-^{14}C in Placenta-Schnitten in Abhängigkeit von der Oestradiol-Konzentration.

Oberer Teil: Δ^4-Androsten-3,17-dion-Umsatz in µMol/l [rechte Ordinate]

Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration: 2,2µMol/l

Zur Methodik vergleiche Abb.9

Ferner vermindert Oestradiol, wie Abb.12 zeigt, im Bereich von 0 bis 20µMol/l den Umsatz von Δ^4-Androsten-3,17-dion in der Inkubationslösung von etwa 90% auf 10%. Bei höheren Oestradiol-Konzentrationen war eine weitere Senkung des Δ^4-Androsten-3,17-dion-Umsatzes nicht feststellbar.

Dieser Effekt von Oestradiol auf den Δ^4-Androsten-3,17-dion-Stoffwechsel könnte durch die Konkurrenz beider Steroide um hydroxylierende und veresternde Enzymsysteme bedingt sein. Hydroxylierte und damit besser wasserlösliche Substanzen werden bei der Aufarbeitung durch die organischen Lösungsmittel nur in geringem Umfang extrahiert. Auf dem Dünnschichtchromatogramm des Extraktes erscheinen daher zum größten Teil nur die lipophilen Steroide, so daß bei niedriger Oestradiol-Konzentration ein großer Teil des Δ^4-Androsten-3,17-dions nicht wieder gefunden wird und damit ein starker Umsatz des Δ^4-Androsten-3,17-dions angezeigt wird.

Über die Abhängigkeit der Bildung von Tritium-markiertem Testosteron und der HTO-Bildung von der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration in der Placenta bei gleichbleibender Oestradiol-17α-T-Konzentration unterrichtet Abb.13. Danach nimmt die Ausbeute an tritiertem Testosteron mit steigender Menge Δ^4-Androsten-3,17-dion zu.

Transformiert man diese Beziehung beider Größen nach Lineweaver und Burk [Ausbeute in % pro Zeiteinheit Reaktionsgeschwindigkeit]

in die Beziehung 1/v und 1/[S], so ergibt sich die Michaelis-Menten-Konstante für Δ^4-Androsten-3,17-dion zu $K_m = 3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

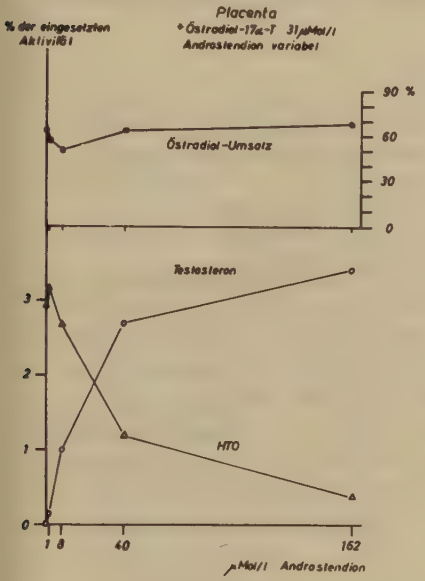


Abb. 13

Einfluß der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration auf den Oestradiol-Umsatz und den Tritium-Einbau in Testosteron und HTO.

Linke Ordinate : Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität

Rechte Ordinate: Oestradiol-Umsatz in % der eingesetzten Aktivität

Oestradiol-Umsatz: Eingesetzte - wiedergefundene Menge.

Einzelheiten der Inkubationsbedingungen vergleiche Text der Legende zu Abb. 9.

Die Summen der Ausbeuten an Testosteron und HTO ist annähernd konstant. Möglicherweise wird das bei der Oestradiol-Oxydation gebildete NAD-T- oder NADP-T-Molekül am gleichen Zellort bei höherer Konzentration von Δ^4-Androsten-3,17-dion zu dessen Reduktion verwendet und nicht zu HTO oxydiert.

C 3c. <u>Anteil des Oestradiol-Wasserstoffs bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion zu Testosteron in Placenta und Ovar</u>

Untersuchungen bei gleichzeitiger Gabe von ^{14}C-markiertem Δ^4-Androsten-3,17-dion und Oestradiol-17α-T sollten mit Hilfe der spezifischen Tritium-Aktivität des doppeltmarkierten Testosterons Aufschluß geben über den vom Oestradiol-17α-T stammenden Anteil der Reduktionsäquivalente im Verhältnis zur Gesamtreduktion.

Nach den in Abb. 14 aufgeführten Ergebnissen erreicht die spezifische Aktivität von Testosteron-17α-T in Placenta unabhängig

von der Oestradiol-Menge etwa 45% der spezifischen Aktivität des eingesetzten Oestradiols-17α-T.

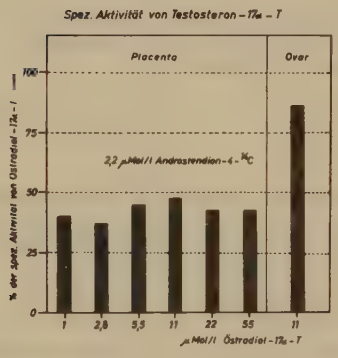


Abb. 14

Relative spezifische Aktivität des Tritium-markierten Testosterons in Placenta und Ovar in Abhängigkeit von der Oestradiol-Konzentration.
Dem Gewebe wurde Δ^4-Androsten-3,17-dion-4-^{14}C und Oestradiol-17α-T zugesetzt.
Nach Isolierung des doppeltmarkierten Testosteron wurden über die spezifische Aktivität des Δ^4-Androsten-3,17-dion [µCi ^{14}C/µMol] aus der ^{14}C-Aktivität die µMole bestimmt. Mit Hilfe des Tritium-Anteiles im Testosteron konnte dann die spezifische Aktivität in µCi ^{3}H/µMol Testosteron berechnet und auf die spezifische Aktivität des Oestradiol-17α-T [=100%] bezogen werden.

In Ovarien betrug der Wert sogar 80%. Läßt man Isotopieeffekte außer acht, so muß man also annehmen, daß in Placenta und Ovar mindestens jedes zweite Wasserstoff-übertragende Coenzym, das zur Reduktion von Testosteron verbraucht wird, primär sein Wasserstoffatom vom gleichzeitig anwesenden Oestradiol bei dessen Oxydation zu Oestron erhält.

C 3d. Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität des Tritium-acceptors Δ^4-Androsten-3,17-dion mit anderen Androgenen

Die nachfolgenden Untersuchungen sollen zeigen, ob eine strenge Substratspezifität in Bezug auf das den Wasserstofftransfer zwischen Oestradiol und reduzierbaren Androgenen katalysierenden Enzyms besteht, oder ob der Wasserstofftransfer unabhängig ist von der Konfiguration des Androgens, das als Tritiumacceptor fungiert.
Die Ergebnisse von Inkubationsversuchen mit Placenta von Ratten

und Oestradiol-17α-T als Tritium-Donator in Gegenwart freier bzw. veresterter Ring-A-ungesättigter Androsten-Derivate und Androstan-Derivate sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tritium-Acceptor	Tritium-Einbau in % der eingesetzten Aktivität in			
	Testosteron	5α-Androstan-3α, 17β-diol	5α-Androstan-3β, 17β-diol	5β-Androstan-3α, 17β-diol
Δ^4-Androsten-3,17-dion	14,9	-	-	-
Testosteron	9,6	-	-	-
Testosteron-acetat	7,2	-	-	-
Testosteron-propionat	3,8	-	-	-
Δ^5-Androsten-3,17-diol	-	-	-	-
Δ^4-Androsten-3,17-diol	0,9	-	-	-
5α-Androstandion	-	-	-	-
5β-Androstandion	-	-	-	-
5α-Androstan-3α-ol, 17-on	-	-	-	-
5α-Androstan-3β-ol, 17-on	-	-	-	-
5β-Androstan-3α-ol, 17-on	-	-	-	-
5β-Androstan-3β-ol, 17-on	-	-	-	-
5α-Androstan-3-on, 17β-ol	-	-	-	-
5β-Androstan-3-on, 17β-ol	-	-	-	-
5α-Androstan-3α, 17β-diol	-	-	-	-
5α-Androstan-3β, 17β-diol	-	-	-	-
5β-Androstan-3α, 17β-diol	-	-	-	-

Tab. 10 Abhängigkeit der Androgenreduktion durch Oestradiol von der Androgenkonfiguration.
Versuche mit Placenten von trächtigen Rattenweibchen [15 Tage].
Androgen-Konzentration: 100 µMol/l
Oestradiol-17α-T-Konzentration: 36 µMol/l [15,2 µCi]
Inkubationsbedingungen: Ringer-Phosphat-Puffer [pH 7,4], 100 - 150 mg Gewebeschnitte, 30 Minuten aerob geschüttelt.
- bedeutet nicht nachweisbar.

Wie aus der Tab. 10 ersichtlich, bilden ausschließlich Ring-A-ungesättigte Androsten-Derivate Testosteron, Ring-A-gesättigte Androstan-Derivate sind als Tritiumacceptoren wirkungslos. Dieser Befund deutet an, daß die Enzymausstattungen der einzelnen Organe [Placenta und Leber] in Bezug auf die Wasserstoff-Übertragung zwischen Oestradiol und Androgenen streng spezifisch sind, da in der intakten Leberzelle von weiblichen Ratten sowohl

Ring-A-ungesättigte Androsten-Derivate als auch Ring-A-gesättigte Androstan-Derivate als Tritiumacceptoren wirksam sind, für Tritium, das aus der 17-Position von Oestradiol-17α-T oxydativ abgespalten wurde.

C 4. Untersuchungen mit der Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten

C 4a. Bildung Tritium-markierter Androstendion-Metabolite durch Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T und Identifizierungsmaßnahmen

Für die Biogenese von Testosteron aus 4,5-ungesättigten Androsten-Vorstufen und für die Bildung biologisch aktiver Androstandiole könnte die wasserstoffübertragende Reaktion zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion von Bedeutung sein, da Oestradiol den bei der Oestron-Bildung abgespaltenen Wasserstoff teilweise für die Hydrierung von Δ^4-Androsten-3,17-dion bereitstellt. Deshalb erscheint ein genaueres Studium dieses Enzyms bzw. Enzymsystems gerechtfertigt. Die Untersuchungen beschränken sich ausschließlich auf die Mikrosomenfraktion der Lebern weiblicher Ratten.

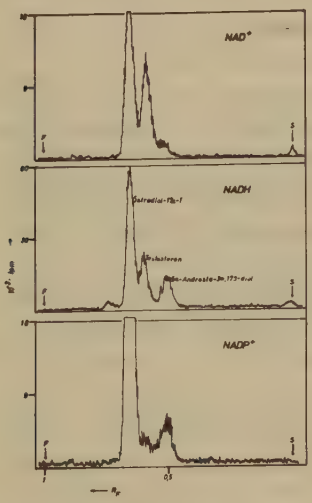


Abb. 15

Radio-Dünnschichtchromatogramm der Metabolite von Δ^4-Androsten-3,17-dion und Oestradiol nach Inkubation mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten nach Zugabe von NAD^+, NADH und $NADP^+$.

Inkubationsbedingungen: 15 Min., 0,2 ml Mikrosomensuspension [entsprechend 0,2 g Leber Frischgewicht] in 4,1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer [pH 7,4] bei 37°C.

Oestradiol-17α-T-Konzentration: 9,33 µMol/l
Androstendion-Konzentration: 100 µMol/l und je 3 mg NAD^+, $NADP^+$, NADH/4,1 ml.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF-Platten, zwei Stunden im "offenen System" [Verdunsten des Fließmittels vom freien Ende der Dünnschichtplatte] aufsteigend im Laufmittel Chloroform/Aceton 9:1 entwickelt.

Nach Inkubation von Oestradiol-17α-T mit der Mikrosomenfraktion der Leber weiblicher Ratten in Gegenwart von NAD^+, NADH und $NADP^+$ und von nicht radioaktiv-markiertem Δ^4-Androsten-3,17-dion, das als Tritiumacceptor fungiert, wurden neben dem eingesetzten Oestradiol-17α-T zwei Tritium-markierte Androstendion-Metabolite nachgewiesen. Diese konnten als Testosteron und 5α-Androstan-3α,17ß-diol identifiziert werden [siehe Abb.15]. Für die Bildung der Tritium-markierten Verbindungen war die Anwesenheit der wasserstoffübertragenden Pyridinnukleotide erforderlich. Fehlten die Pyridinnukleotide im Inkubationsansatz, lag die Ausbeute an Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metaboliten unter 1% der eingesetzten Radioaktivität.

Die Identifizierung dieser Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite erfolgte auf Grund ihres Verhaltens beim Anfärben mit Antimontrichlorid/Eisessig. Die Substanzen zeigten Blaufärbung, was als spezifischer Nachweis für Androgene gilt. Außerdem wurde das Verhalten der Substanzen bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF-Fertigplatten [Merck, Darmstadt] in drei verschiedenen Fließmitteln geprüft [Cyclohexan/Essigester 1:1, Chloroform/Aceton 9:1 und Chloroform/Methanol 9:1] und R_F-Wert-Übereinstimmung mit authentischen Substanzen festgestellt. Zusätzlich wurden die Substanzen durch ihre Oxydationsprodukte charakterisiert [Oxydation mit Chromtrioxyd/Eisessig] und die Mono- bzw. Di-Acetate gebildet [Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin]. Als letzte Maßnahme zur Identifizierung der Substanzen wurde die Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität [Ipm/mg] aus verschiedenen Lösungsmitteln herangezogen [siehe Tab.11].

Das mikrosomale Enzym ist relativ stabil. Nach dreitägiger Aufbewahrung bei +4°C wurde keine Abnahme der Aktivität beobachtet. Nach 14 Tagen hatte die Aktivität 25 - 30%, nach 21 Tagen 85 - 90% abgenommen.

nachgew. Verbindg.	Chromatographie im System [R_F-Werte]			Farbe mit $SbCl_3$/ Eisessig	UV-Absorpt.	identifiziert als	nach Oxidation R_F-Wert identisch mit	nach Acetylieren R_F-Wert identisch mit
	I	II	III					
S_1	0,38	0,72	0,54	blau	positiv	Testosteron	Androstendion	Testosteronacetat
S_2	0,51	0,63	0,43	blau	negativ	5α-Androstan-3α, 17ß-diol	5α-Androstan-3, 17-dion	5α-Androstan-3α, 17ß-diacetat

Umkristallisation

Lösungsmittel	Anzahl der Kristallisationen	Spezifische Aktivität Ipm/mg	
		Testosteron	5α-Androstan-3α, 17ß-diol
Äthanol	1.	733	375
	2.	718	340
Chloroform	1.	729	356
	2.	737	353
	3.	725	361

Tab. 11 Oben:

Charakterisierung der nach Inkubation mit Oestradiol-17α-T in Gegenwart von nicht-markiertem Δ^4-Androsten-3,17-dion mit der Mikrosomenfraktion aus Lebern weiblicher Ratten nachgewiesenen Tritium-markierten Verbindungen. Einzelheiten siehe Methodik Seite 7 und 8.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF.
System I : Cyclohexan/Essigester 1:1
System II : Chloroform/Aceton 9:1
System III: Chloroform/Methanol 9:1

S_1=Testosteron, S_2=5α-Androstan-3α,17ß-diol in Abb. 15

Unten:

Identifizierung der Tritium-markierten Verbindungen nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung. Zu jeder der aufgeführten Verbindung wurde 0,1 g authentischer, nicht markierter Substanz zugesetzt, aus zwei verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert und die spezifische Aktivität bestimmt.

C 4b. Coenzymspezifität

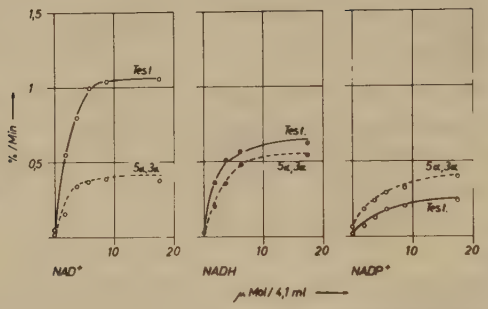


Abb. 16 Abhängigkeit der Wasserstoff-Übertragung von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion durch mikrosomales Enzym aus Leber von der NAD^+-, NADH- und $NADP^+$-Konzentration.

Inkubationsdauer 15 Minuten, 0,2 ml Mikrosomenmenge [entsprechend 0,2 g Leber Frischgewicht], in 4,1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer [pH 7,4] bei 37°C.

Oestradiol-17α-T-Konzentration: 9,33µMol/l
Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration: 100µMol/l

Es wurde die Bildung Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite gemessen. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ordinate: %/Min. der eingesetzten Radioaktivität.

Wie aus der Abb. 16 hervorgeht, ist die Ausbeute an Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metaboliten in der Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten von der Art und der Menge des zugesetzten Coenzyms abhängig. Die Ausbeute an Testosteron ist am größten in Gegenwart von NAD^+, $NADP^+$ ist weniger wirksam. Bei der Bildung von 5α-Androstan-3α,17ß-diol bestehen zwischen NAD und NADP keine wesentlichen Unterschiede. Ferner zeigt die Abb. 16, daß die Coenzyme, um maximale Reaktionsgeschwindigkeiten zu erzielen, in etwa stöchiometrischem Verhältnis zur Oestradiol-Konzentration zugesetzt werden müssen.

Die Oxydation der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite [Testosteron und 5α-Androstan-3α,17ß-diol] mit Chromtri-

oxyd/Eisessig führte zu einem weitgehenden Verlust der Tritium-Aktivität in den Oxydationsprodukten. Mehr als 96% der eingesetzten Tritium-Aktivität wurde nach Gefrierdestillation der alkalisierten wässrigen Phase im Oxydationswasser wiedergefunden. Folglich wurde - unabhängig vom zugesetzten Coenzym - das Tritium zur Reduktion der Keto- zu Hydroxy-Gruppen herangezogen und nicht zur Reduktion der 4,5-Doppelbindung in Ring A des Steroidgerüstes. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da $NADP^+$ das bevorzugte wasserstoffübertragende Coenzym der Δ^4-Reduktase ist.

Die folgenden Untersuchungen dienten zur Festlegung einiger Merkmale des hier nachgewiesenen - die Wasserstoff-Übertragung zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion katalysierenden - mikrosomalen Enzyms. Die Enzymcharakteristika sollen verglichen werden mit denen von bekannten mikrosomalen 17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen. Dazu wurden durchgeführt: Kinetische Untersuchungen, K_m-Wert Bestimmungen und Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung der Wasserstoff-Übertragung zwischen Oestrogenen und Androgenen.

C 4c. Kinetische Untersuchungen

Abb. 17 zeigt, daß im Bereich zwischen 0 bis 0,3 ml Mikrosomenfraktion in Gegenwart von NAD^+, NADH und $NADP^+$ Linearität besteht zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Bildung Tritium-markierten Testosterons, fürdas sexualspezifische Androstandiol [5α,3α] besteht Linearität im Bereich von 0 bis 0,2 ml.

Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Tritium-Übertragung durch die Mikrosomenfraktion von Oestradiol-17α-T auf reduzierte Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite ist in der Abb. 18 dargestellt.
Zwischen 0 und 120 Minuten wird ein stetiger Anstieg des Umsatzes beobachtet, der bis etwa 15 Minuten linear ist.

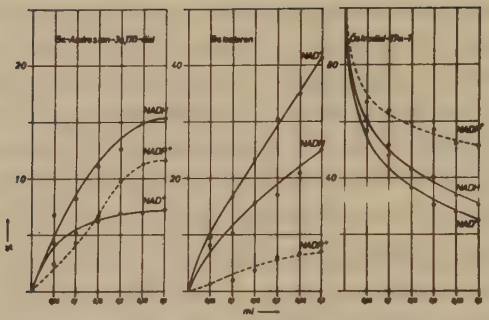


Abb.17 Wasserstoff-Übertragung zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion durch das mikrosomale Enzym aus Lebern weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der Enzymmenge.

Jeweils 9,33µMol/l Oestradiol-17α-T und 100µMol/l Δ^4-Androsten-3,17-dion wurden mit steigenden Mengen der Mikrosomenfraktion [0 - 0,3 ml der Mikrosomenfraktion entsprechen 0 - 0,3 g Leber Frischgewicht] und je 3 mg NAD^+, NADH und $NADP^+$ in 0,2 m Soerensen-Phosphat-Puffer [pH 7,4] inkubiert.
Es wurde die Bildung von Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Derivaten gemessen. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.
Alle Versuche wurden in 4,1 ml Puffer 15 Minuten lang bei 37°C durchgeführt.

Ordinate: % der eingesetzten Radioaktivität

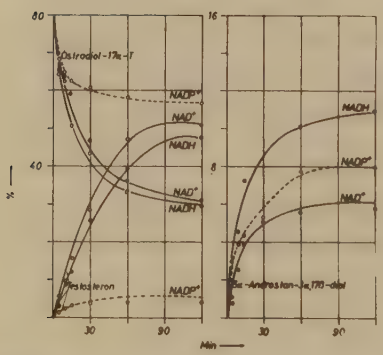


Abb.18

Zeitlicher Verlauf der Bildung Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite durch das mikrosomale Enzym aus Lebern weiblicher Ratten [Mikrosomenfraktion entsprechend 0,05 g Leber Frischgewicht]. Inkubationsbedingungen siehe Methodik und Legende der Abb.17.

Es wurde die Bildung Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite gemessen. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ordinate: % der eingesetzten Radioaktivität.

Links: Oestradiol-17α-T und Testosteron-17α-T
Rechts: Tritium-markiertes Androstandiol

Wie aus der folgenden Abb.19 hervorgeht, zeigt die Bildung Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite durch mikrosomale Enzympräparation aus Lebern weiblicher Ratten ein pH-Optimum von 6,4 bis 6,8 je nach verwendetem Coenzym.

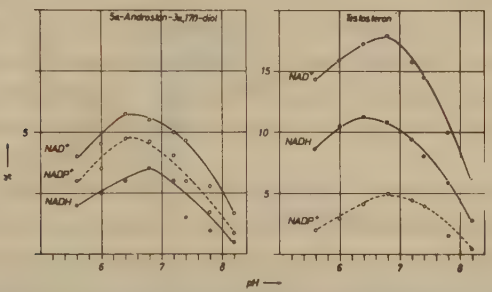


Abb.19 Abhängigkeit der Aktivität des mikrosomalen Enzyms von der Wasserstoffionen-Konzentration [weibliche Ratten].

Ansatz mit Soerensen-Phosphat-Puffer [pH Bereich 5,6-8,2], Inkubationsdauer 60 Minuten.

Einzelheiten siehe Methodik und Legende zu Abb.17. Gemessen wurden die Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates [Oestradiol-17α-T] mit und ohne Zusatz von Δ^4-Androsten-3,17-dion ist in Form der Lineweaver/Burk/Transformation in Abb.20 dargestellt. Es ist zu erwarten, daß Δ^4-Androsten-3,17-dion und Oestradiol, die große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, beide um die gleichen aktiven Bezirke der 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase konkurrieren. In diesem Fall müßte sich die Neigung der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm verändern. Der Schnittpunkt auf der Ordinate wird gegenüber der "ungehemmten" Reaktion unverändert bleiben, da die maximal Geschwindigkeiten bei beiden Reaktionen die selben bleiben. Selbstverständlich muß hingegen der Schnittpunkt auf der Abszisse gegenüber der "ungehemmten" Reaktion verschoben werden. Als Maß für die Oxydation der 17-Position von Oestradiol durch die mikrosomale 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase wurde angenommen:

1. die Differenz zwischen eingesetzter Oestradiol-17α-T-Menge und nach Inkubation wiedergefundener Oestradiol-17α-T-Menge und 2. das Ausmaß der auf die gebildeten Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite übertragenden Tritium-Aktivität.

Voraussetzung für die K_m-Wert Bestimmung ist hier, daß die hydroxylierenden Nebenreaktionen verglichen mit der Oestron-Bildung gering sind. Die Abb. 15 zeigt, daß der hochpolare Substanzgipfel im Startbereich, in dem die stark hydrophilen hydroxylierten Metabolite zusammengefaßt sind, vernachlässigt werden kann.

Bei einem pH-Wert von 7,4 betrug der K_m-Wert für Oestradiol ohne gleichzeitige Anwesenheit von Δ^4-Androsten-3,17-dion im Inkubationsmedium $1{,}25 \cdot 10^{-5}$M. Bei Zusatz von Δ^4-Androsten-3,17-dion zum Inkubationsmedium nimmt die Michaelis-Menten-Konstante ab.

Oestradiol : Androstendion	1:125	K_m-Wert	$1{,}67 \cdot 10^{-6}$M
" "	1: 12,5	"	$7{,}14 \cdot 10^{-6}$M
" "	1: 1,25	"	$9{,}52 \cdot 10^{-6}$M

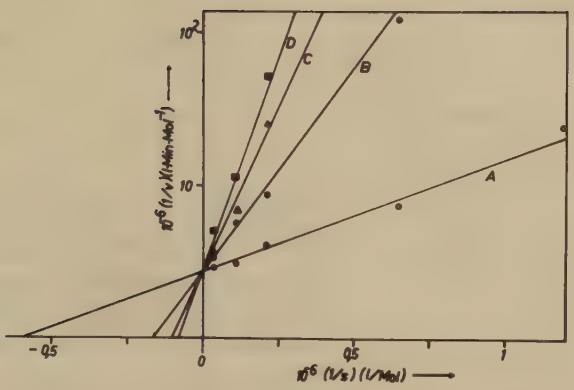


Abb.20 Oxydation von Oestradiol zu Oestron durch ein mikrosomales Enzym mit wasserstoffübertragender Funktion zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion aus Lebern weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der Konzentration von Oestradiol mit und ohne Zusatz von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion.

Steigende Mengen von Oestradiol-17α-T wurden sowohl in Gegenwart als auch ohne Zusatz von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion mit der Mikrosomenfraktion [entsprechend 0,2 g Leber Frischgewicht], 3 mg NAD^+ in 4,1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer [pH 7,4] 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

Es wurde 1. in den Kurven A] B] C] die Bildung Tritium-markierten Testosterons und 2. in der Kurve D] die Oestron-Bildung [eingesetztes Oestradiol minus wiedergefundenes Oestradiol] gemessen.

Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Konzentration der Substrate im Inkubationsansatz:

Kurve A] Oestradiol-17α-T [0,8 - 36µMol/l] in Gegenwart von inaktivem Androstendion, das in einem konstanten Konzentrationsverhältnis Oestradiol/Androstendion von 1:125 zugesetzt wurde, gemessen wurde gemäß 1.

Kurve B] Oestradiol-17α-T [0,8 - 36µMol/l] Konzentrationsverhältnis Oestradiol/Androstendion von 1:12,5. Gemessen wurde gemäß 1.

Kurve C] Oestradiol-17α-T [0,8 - 36µMol/l] Konzentrationsverhältnis Oestradiol/Androstendion von 1:1,25. Gemessen wurde gemäß 1.

Kurve D] Oestradiol-17α-T [0,8 - 36µMol/l] ohne Zusatz von inaktivem Androstendion. Gemessen wurde gemäß 2.

C 4d. Versuche zur Temperaturabhängigkeit des Wasserstoff-Transfers

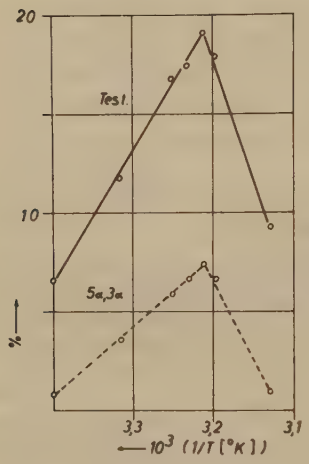


Abb.21

Abhängigkeit der mikrosomalen Enzymaktivität aus Lebern weiblicher Ratten von der Temperatur.

Mikrosomenmenge [entsprechend 0,2g Leber Frischgewicht] wurden bei verschiedenen Temperaturen [22-45°C] inkubiert. Als Coenzym diente NAD^+.

Einzelheiten der Inkubationsbedingungen siehe Methodik und Legende zu Abb.15.
Gemessen wurden die Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ordinate: % der eingesetzten Radioaktivität.

Die Abhängigkeit der wasserstoffübertragenden Reaktion von der Temperatur im Bereich zwischen 22 bis 45°C ist in der Abb.21 wiedergegeben. Das Temperaturoptimum der mikrosomalen Reaktion liegt bei 38°C.

C 4e. Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung des Wasserstoff-Transfers

In Tab.12 sind die Ergebnisse der Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung zusammengestellt. Keine der untersuchten Verbindungen hatte einen aktivierenden Einfluß auf das mikrosomale Enzym, das die Wasserstoffübertragung von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion katalysiert. In einer Endkonzentration von 10^{-3} Mol/l werden ausschließlich Hemmungen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet.

Zugesetzte Verbindung	Endkonzentration [Mol/l]	gebildete Menge Tritium-markierter Androgene [% der einges. Aktivität]	Änderung gegenüber dem Kontrollwert [%]
keine	-	21	-
p-Chlormercuri-benzoat	10^{-3}	7	67
Jodacetamid	10^{-3}	14	34
$MgCl_2$	10^{-3}	19	9
$ZnCl_2$	10^{-3}	16	24

Tab. 12 Wirkung verschiedener Substanzen auf die Wasserstoff-Übertragung von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion durch die Mikrosomenfraktion von Lebern weiblicher Ratten.

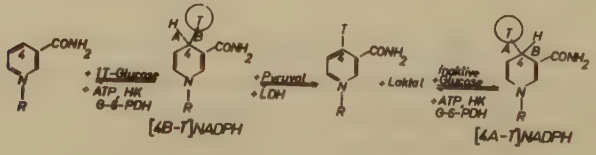
Jeweils 9,33µMol/l Oestradiol-17α-T und 100µMol/l Δ^4-Androsten-3,17-dion wurden mit der Mikrosomenfraktion [entsprechend 1 g Leber Frischgewicht], 3 mg NAD^+, 30 Minuten lang bei 37°C in 4,1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer [pH 7,4] unter Zusatz der jeweiligen Inhibitoren inkubiert.

Es wurde die Bildung der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite gemessen.

C 5. Untersuchungen zur Stereospezifität der enzymatischen Tritium-Übertragung mittels NADP zur Hydrierung der Doppelbindung in Ring A und der Ketogruppen

In den folgenden Untersuchungen soll mit einer mikrosomalen Enzympräparation aus der Leber weiblicher Ratten die Stereochemie der NADPH-abhängigen Hydrierung der 4,5-Doppelbindung in Ring A des Steroidgerüstes von Δ^4-Androsten-3,17-dion und der Ketogruppen in 3- und 17-Position untersucht werden. Gleichzeitig sollen Unterschiede aufgedeckt werden zwischen Oestradiol als NADP-generierendes System, das als spezifischer Wasserstoffdonator im reduktiven Androgenstoffwechsel angesehen werden muß, und andererseits einem zusammengesetzten enzymatischen System zur spezifischen Bildung von NADPH der A- und der B-Form in Bezug auf die Reduktorwirkung bei der Hydrierung des Δ^4-Androsten-3,17-dion-Moleküls. Die Untersuchungen werden durchgeführt mit stereospezifisch Tritium-markiertem NADP-T.

Aus den Untersuchungen von Vennesland und Westheimer [32] ist bekannt, daß die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase den Wasserstoff vom C-1 beim Glukose-6-phophat zu der B-Seite des NADP überträgt. Gleiches gilt für die 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase, die den Wasserstoff aus der 17-Position von Oestradiol zu der B-Seite von NAD überträgt [33]. Durch Kombination der Hexokinase-reaktion mit der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion wurde in den folgenden Untersuchungen das Tritium von Glukose-1-T unter intermediärer Bildung von Glukose-1-T-6-Phosphat auf die B-Seite von NADP übertragen [siehe folgendes Schema].



[4A-T]NADPH wurde hergestellt aus der B-Form durch Zufügen von Pyruvat, Laktat-Dehydrogenase und Glukose, die nicht radioaktiv markiert war. Dabei wurde das ursprünglich gebildete [4B-T]NADPH intermediär zu [T]$NADP^+$ oxydiert und anschließend erneut unter Bildung des sterisch umgewandelten [4A-T]NADPH reduziert [34].

Beide stereospezifischen Formen des Tritium-markierten Coenzyms wurden als Wasserstoffdonatoren zur Hydrierung der 4,5-Doppelbindung und der Ketogruppen eingesetzt. Zum Vergleich wurde verwendet Tritium-markiertes NADP-T, das durch eine mikrosomale 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase mit Oestradiol-17α-T als Tritium-Donator erzeugt wurde.

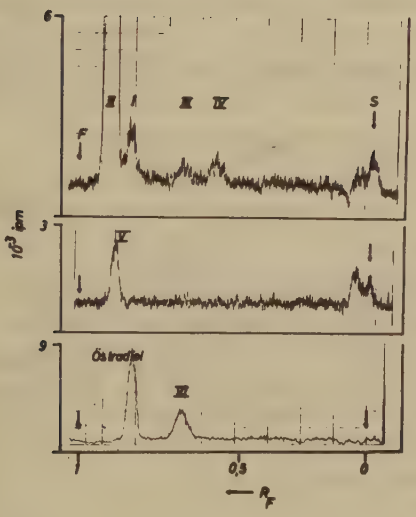


Abb. 22

Radio-Dünnschicht-Chromatogramm der Metabolite von Δ^4-Androsten-3,17-dion nach Inkubation mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten und spezifisch gebildetem NADP-T der
B-Form [4B-T]NADPH [oben]
A-Form [4A-T]NADPH [mitte]
durch Oestradiol-17α-T generiertes NADP-T [unten].

Methodik zur spezifischen Bildung von NADP-T der A- und der B-Form vergleiche Abschnitt Methodik Seite 8 und 9.

Inkubationsbedingungen:
0,2 ml Mikrosomensuspension [entsprechend 0,2 g Leber Frischgewicht] in Tris-Puffer-Lösung [Gesamtlösung 4,1 ml], pH 7,4 bei 37°C unter Luftzutritt.

Oestradiol-17α-T-Konzentration: 9,33µMol/l
Androstendion-Konzentration: 100µMol/l

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel HF-Fertigplatten [Merck, Darmstadt], Schichtdicke 25 mm, zwei Stunden im "offenen System" [Verdunsten des Fließmittels vom freien Ende der Dünnschichtplatte] aufsteigend im Laufmittel Cyclohexan/Essigester 1:1 entwickelt, anschließend die noch nasse Platte im geschlossenen System im gleichen Fließmittel bis zum Plattenende chromatographiert.

Die Abb.22 zeigt, daß bevorzugt das Wasserstoff-Atom der B-Seite des reduzierten NADP zur Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion verwendet wird.

Die Tritium-markierten Substanzgipfel im Radiochromatogramm konnten identifiziert werden als Testosteron, 5α-Androstandion, 5α-Androstan-ol,on, und 5α-Androstan-3α,17ß-diol. Die Identifizierungsmaßnahmen sind in der Tab.13 zusammengefaßt und entsprechen denen auf Seite 11 und 12 und der Methodik auf Seite 8 ausführlich beschriebenen.

Nachgew. Verbindg.	Chromatographie im System I [R_F-Werte]	II	Farbe mit 70 % alkoh. H_2SO_4	UV-Absorpt.	identifiziert als	R_F-Wert identisch nach Oxidation mit	nach Reduktion mit	nach Acetylieren mit
S I.	0,80	0,32	gelbbraun	negativ	5α-Androstan-3αol,17on	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3α, 17-diol	5α-Androstan-3α monoacetat-17on
S II.	0,86	0,52	gelbbraun	negativ	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3,17-diol	-
S III.	0,62	0,22	grün	positiv	Testosteron	Androstendion	Testosteron	Testosteron-acetat
S.IV.	0,52	0,19	gelbbraun	negativ	5α-Androstan-3α,17ß-diol	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3α,17ß-diol	5α-Androstan-3α,17ß-diacetat
S V.	0,86	0,52	gelbbraun	negativ	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-3,17-diol	-
S VI.	0,62	0,22	grün	positiv	Testosteron	Androstendion	Testosteron	Testosteron-acetat

Tab.13 Charakterisierung der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite, die nach Inkubation mit Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten, Δ^4-Androsten-3,17-dion und NADPH der A- und der B-Form zur Feststellung der Stereospezifität der Hydrierung der 4,5-Doppelbindung in Ring A des Δ^4-Androsten-3,17-dion-Moleküls und der Ketogruppen in 3- und 17-Position entstanden sind.

Einzelheiten siehe Methodik Seite 8.

System I : Cyclohexan/Essigester 1:1
System II: Benzol/Äthanol 19:1

Wurde [4A-T]NADPH als Tritium-markiertes Coenzym zur Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion eingesetzt, entstand ausschließlich Tritium-markiertes 5α-Androstandion, was als Folge einer inkompletten Oxydation von [4B-T]NADPH durch Pyruvat und Laktat-De-

hydrogenase gedeutet werden kann. Das durch Oestradiol-17α-T erzeugte NADP wird ausschließlich zur Bildung von Testosteron verwendet. Ring-A-gesättigte Verbindungen waren nicht nachweisbar.

Die Oxydation der Tritium-markierten Androstan-Derivate mit Chromtrioxyd/Eisessig ergab, daß das Tritium zu 93 - 96% in die 4,5-Doppelbindung eingebaut wurde und nur zu einem geringen Teil in die 3- und/oder 17-Position unter Bildung von Hydroxygruppen.

Die quantitativen Ergebnisse sind in Tab. 14 festgehalten. Die Ergebnisse zeigen die Bevorzugung von [4B-T]NADPH gegenüber [4A-T]NADPH um den Faktor 47, wenn die Ausbeuten an 5α-Androstan-3,17-dion verglichen werden.

5α-Androstan-[ol,on], 5α-Androstan-3α,17ß-diol und Testosteron wurden ausschließlich gebildet in Gegenwart von [4B-T]NADPH, [4A-T]NADPH war dagegen wirkungslos. Durch Oestradiol-17α-T generiertes NADP-T wurde ausschließlich zur Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion unter Bildung von Tritium-markiertem Testosteron verwendet. Tritium-markierte Ring-A-gesättigte Androstan-Derivate waren nicht nachweisbar.

Coenzym	^{3}H-Einbau in % der eingesetzten Aktivität in			
	5α-Androstan-3,17-dion	5α-Androstan-[ol, on]	5α-Androstan-3α, 17ß-diol	Testosteron
A - NADP^{3}H	0,31	<	<	<
B - NADP^{3}H	14,49	1,22	0,42	0,68
NADP^{3}H [Oestradiol]	<	<	<	28,4

Tab. 14 Quantitative Ausbeuten an Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metaboliten durch Tritium-Transfer von [4A-T] NADPH und [4B-T]NADPH und durch Oestradiol-17α-T generiertes NADP-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in der Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten.
< nicht nachweisbar

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in der Leber, in der Placenta und in den Ovarien von Ratten Enzyme oder Enzymsysteme vorhanden sind, die bei der Oxydation von Oestradiol zu Oestron das abgespaltene Hydrid-Ion zur Reduktion von neutralen 3,17-Oxo- zu 3,17-Hydroxy-Androgenen verwenden.
Die Frage, ob diese Enzyme oder Enzymsysteme identisch sind mit den Substrat-unspezifischen NAD- bzw. NADP-abhängigen 3+17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen, die die Oxydoreduktion von neutralen und phenolischen 3,17-Oxosteroiden und 3,17-Hydroxysteroiden katalysieren oder ob es sich um spezifische Enzyme mit "Transhydrogenase-Funktion" zwischen Oestradiol und Androgenen handelt, konnte nicht endgültig geklärt werden.

Argumente für die erste Möglichkeit liefern die Befunde zur Coenzymspezifität, der kinetischen Untersuchungen und der Versuche zur Inaktivierung und Aktivierung der wasserstoffübertragenden Reaktion mit Mikrosomenpräparationen von Lebern weiblicher Ratten [siehe Seite 35-49], die mit den Enzymcharakteristika bekannter mikrosomaler 3- und 17-Hydroxy-Oxydoreduktasen weitgehend übereinstimmen [1,2].

Um einen eindeutigen Identitätsbeweis antreten zu können, ob das hier beschriebene mikrosomale Enzym mit "Transhydrogenase-Funktion" zwischen Oestradiol und Androgenen übereinstimmt mit bekannten mikrosomalen 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen aus Rattenleber, bedurfte es der Trennung der "Mikrosomen" in Unterfraktionen, um so Enzymaktivitäten zu separieren. Aber trotz vieler solcher Bemühungen sind die Erfolge bisher bescheiden.
Erst wenn es gelingt, dieses Problem zu bewältigen, ist ein eindeutiger Identitätsbeweis zu führen. Bis dahin müssen Vergleiche von Enzymcharakteristika und kinetische Studien für einen Identitätsbeweis ausreichen.

Tab.15 Vergleich zwischen den Enzymcharakteristika einer bekannten mikrosomalen 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase und dem hier dargestellten Enzym.

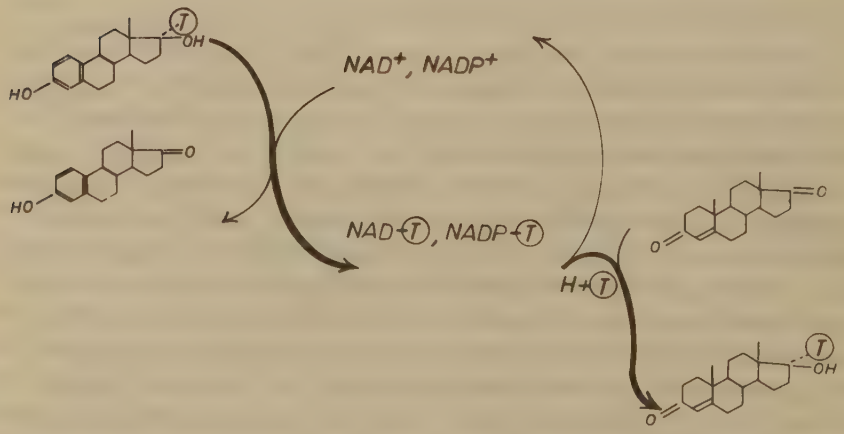
	bekanntes Enzym [35]	unser Enzym
pH-Optimum	6,4	6,4 - 6,8
Temperatur-optimum	42°C	38°C
K_m-Wert	$2,2 \cdot 10^{-6}$M $3,3 \cdot 10^{-5}$M [36]	$1,25 \cdot 10^{-5}$M ohne Androstendion-Zusatz $1,67 \cdot 10^{-6}$M bis $9,52 \cdot 10^{-6}$M mit Androstendion-Zusatz
Hemmbarkeit	p-Chlormercuri-benzoat Jodacetamid $MgCl_2$ $ZnCl_2$	p-Chlormercuri-benzoat Jodacetamid $MgCl_2$ $ZnCl_2$
Coenzym	NAD, NADP	NAD, NADP

Das pH-Optimum der mikrosomalen Hydrierung von Δ^4-Androsten-3,17-dion durch von Oestradiol stammenden Wasserstoff liegt bei 6,8. Aus dem Verlauf der pH-Kurven geht hervor, daß der Umsatz im sauren Bereich etwa 2-6mal so groß ist wie im alkalischen. Die Temperaturabhängigkeit zeigt ein Optimum bei 38°C. Das mikrosomale Enzym besitzt - ähnlich wie auch andere NAD-/NADP-abhängige 17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen - funktionelle SH-Gruppen. Diese können durch Schwermetall-Ionen sowie durch typische SH-Gruppen blockierende Verbindungen, wie Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat, gehemmt werden. Für Oestradiol-17α-T beträgt die Michaelis-Menten-Konstante bei einem pH-Wert von 7,4 und einer mikrosomalen Enzympräparation aus Lebern weiblicher Ratten $1,25 \cdot 10^{-5}$M. Dieser Wert liegt in der Größenordnung bisher bekannter K_m-Werte für mikrosomale 17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen, die in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5}M liegen. Wird dem Inkubationsansatz neben Oestradiol-17α-T Δ^4-Androsten-3,17-dion zugesetzt in einem konstanten Verhältnis Oestradiol :

Δ^4-Androsten-3,17-dion 1 : 125, 1 : 12,5 und 1 : 1,25 nimmt der K_m-Wert ab [1:125 K_m-Wert $1,67 \cdot 10^{-6}$M, 1:12,5 K_m-Wert $7,14 \cdot 10^{-6}$M, 1:1,25 K_m-Wert $9,52 \cdot 10^{-6}$M]. Die relativ niedrigen K_m-Werte in Gegenwart von Δ^4-Androsten-3,17-dion sprechen für eine Verstärkung der Affinität zwischen Enzym und Substrat [siehe auch Diskussionsbemerkung Seite 60/61].

Wie die Untersuchungen mit den mikrosomalen Enzymen zeigen, ist die wasserstoffübertragende Reaktion zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion an die Anwesenheit von Pyridinnukleotiden gebunden [siehe Seite 38]. Ein direkter Wasserstoff-Übergang von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion ohne Coenzym ist ausgeschlossen. NAD ist wirkungsvoller als NADP. Diese Bevorzugung von NAD entspricht den Verhältnissen, wie sie bei Untersuchungen über die Coenzymspezifität der 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen mit phenolischen und neutralen Steroidhormonen als Substrate gefunden wurden.

Die Reaktion läßt sich gemäß folgender Gleichung formulieren:



Da die Untersuchungen mit in 17α-Stellung Tritium-markiertem Oestradiol durchgeführt wurden, müßten bei der Oxydation von Oestradiol zu Oestron die den Wasserstoff intermediär überneh-

menden Pyridinnukleotide ebenfalls Tritium-markiert worden sein. Das so in der intakten Leberzelle, in Ovarien, in Placenta und von Mikrosomenpräparationen der Lebern von Ratten gebildete NAD-T bzw. NADP-T wurde ohne Isolieren für die Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion verwendet. So erklärt es sich, daß aus den Inkubationsmedien Testosteron und Ring-A-gesättigte Androstandiole als Tritium-markierte Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite isoliert werden können.

D 1. Zur Frage der Sexualspezifität der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite

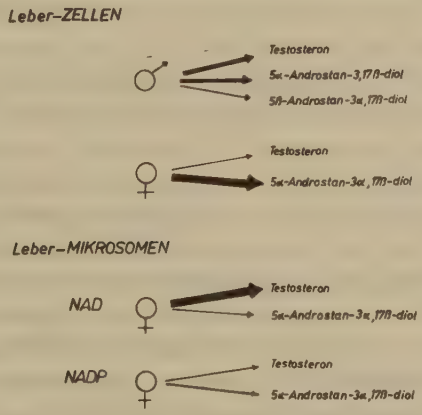
Die enzymatische Reduktion der 4,5-Doppelbindung von Δ^4-3-Keto-Steroiden durch die Δ^4-Reduktase erfolgt sexualspezifisch. Der Geschlechtsunterschied findet seinen Ausdruck in der unterschiedlichen Hydrierung von Δ^4-Androsten-3,17-dion zu Ring-A-gesättigten Verbindungen der 5α- und der 5ß-Reihe. Der unterschiedliche sterische Verlauf führt in intakten Leberzellen männlicher Ratten ausschließlich zu trans-ständigen Androstandiolen, also zu 5α-Androstan-3,17ß-diol und zu 5ß-Androstan-3α, 17ß-diol. Leberzellen weiblicher Ratten hydrieren allein die cis-ständige 5α,3α-konfigurierte Verbindung [siehe Abb. 4 und 5]. Damit werden die Befunde der Durchströmungsversuche an der isolierten Rattenleber von Schriefers und Mitarbeitern [26,27] so wie die Untersuchungen von Hübener und Staib [28,37] bestätigt. Bei Inkubationen mit der Lebermikrosomenfraktion weiblicher Ratten entsteht Androstandiol mit dem H-Atom am C-Atom 5 in α-Position. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden zahlreicher Untersuchungen, wonach die 5α-Reduktase ausschließlich in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist [7] [siehe Abb. 15]. Die Androstandiole waren Tritium-markiert. Um die Position des Tritium-Einbaus in das Androgenmolekül festzustellen, wurden die Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite [Androstandiole und Testosteron] mit Chromtrioxyd/Eisessig oxydiert. Die Oxydation führte zu einem weitgehenden Verlust der Tritium-Aktivität im Androgenmolekül [siehe Seite 14]. Das Tritium wurde in Form von Tritiumwasser [HTO] abgespalten. Das bedeutet, daß ausschließ-

lich die Oxo-Gruppen in Position 3- und/oder 17 durch Tritium reduziert wurden und nicht die 4,5-Doppelbindung in Ring A des Steroidgerüstes. Denn Tritium, das unter Hydrierung der 4,5-Doppelbindung in 4- oder 5-Position eingebaut ist, kann als Tritium-Wasser nicht abgespalten werden. Diese Tatsache ist deswegen so erstaunlich, weil NADP das bevorzugte wasserstoffübertragende Coenzym der Δ^4-Reduktase ist und bei den Mikrosomenversuchen NADPH durch Oestradiol-17α-T erzeugt wurde [siehe auch Diskussionsbemerkung Seite 62].

Neben der geschlechtsspezifischen Stellung der H-Atome bzw. OH-Gruppen am C-Atom 3 und am C-Atom 5 im Androstandiol-Molekül besteht, wie diese Arbeit beweist, in der intakten Leberzelle ein geschlechtsspezifischer quantitativer Unterschied bei der Bildung der Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite. Der Unterschied stellt sich am deutlichsten dar, wenn die Ausbeute an Testosteron verglichen wird. Männliche Ratten bilden um den Faktor 10 bis 15 mehr Testosteron als weibliche [gemessen am relativen Tritium-Einbau in Testosteron] [siehe Seite 17]. Wird der relative Tritium-Einbau in die Androstandiole betrachtet, zeigt sich, daß in Leberzellen weiblicher Ratten mengenmäßig mehr Androstandiol gebildet wird als die Androstandiol-Gesamtfraktion in Leberzellen männlicher Ratten beträgt. Damit wird an Leberschnittpräparationen die an der Lebermikrosomenfraktion wiederholt gefundene Tatsache bestätigt, daß die Δ^4-5α-Reduktase-Aktivität weiblicher Tiere bedeutend größer ist als die der männlichen [38,39]. Außerdem verfügt die Leberzelle männlicher Ratten über ein gegenüber der 3α-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase aktiveres 3ß-Enzym, wie bereits Schriefers und Mitarbeiter [26] zeigen konnten. Entsprechend wurde in der vorgelegten Arbeit bei Inkubationen mit Leberschnitten männlicher Ratten stets mehr Tritium-markiertes 5α-Androstan-3,17ß-diol als 5ß-Androstan-3α,17ß-diol gefunden - in einem fast konstanten Verhältnis von 3:1. Dieser Befund steht auch quantitativ im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Rubin und Strecker [40,41], wonach in Leberhomogenaten männlicher Ratten die 3ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase-Aktivität um den Faktor 2,3 bis 3,5 größer ist als die des 3α-Enzyms.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der Unterschied des Tritium-Einbaus aus Oestradiol-17α-T in reduzierte Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite zwischen der Mikrosomenfraktion aus Leberhomogenat einerseits und intakten Leberzellen weiblicher Ratten andererseits. In Leberzellen wird zum größten Teil Tritium-markiertes 5α-Androstan-3α,17ß-diol gebildet, während mit der Mikrosomenfraktion und NAD als wasserstoffübertragendes Coenzym als Hauptmetabolit Testosteron und in sehr viel geringerer Ausbeute 5α-Androstan-3α,17ß-diol entsteht. Wird dagegen NADP als wasserstoffübertragendes Coenzym verwendet, ist die Ausbeute an Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metaboliten gering, wobei das Verhältnis zwischen Testosteron und 5α-Androstan-3α,17ß-diol um den Faktor 1,5 zugunsten des Androstandiols verschoben ist.

Das nachfolgende Schema faßt die qualitativen Unterschiede zusammen, wobei die Dicke der Pfeile einen Eindruck von dem relativen Ausmaß der Reaktionen gibt.



D 2. Organspezifität

Das Enzym bzw. Enzymsystem, das den Wasserstoffübergang von Oestradiol auf Androgene katalysiert, besitzt eine ausgeprägte Organspezifität. Nur in Leber, Ovarien und in der Placenta konnte mit Oestradiol als Wasserstoffdonator Δ^4-Androsten-3,17-dion reduziert werden. In Placenta und Ovarien entstand als einziger Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolit in 17-Stellung Tritium-markiertes Testosteron.

Nach bisheriger Erkenntnis haben Testosteron und Δ^4-Androsten-3,17-dion im Ovar und in der Placenta eine zweifache Funktion: Einerseits sind sie Vorstufen für die Aromatisierung zu Oestradiol [42,43,44] und andererseits treten sie auch als Inkretionsprodukte [45,46,47] in Erscheinung, so weit sich am Menschen gewonnene Ergebnisse verallgemeinern lassen. Für Testosteron ist kürzlich in Experimenten mit Explantatkulturen von Rattenovarien eine dritte Funktion aufgedeckt worden. Dieses Androgen ist nämlich auch Substrat eines intensiven intraovariellen Steroidumsatzes, dessen Produkte Androgene mit relativ hoher, teils dem Testosteron nahekommender, teils ihm überlegender biologischer Aktivität sind. Die hier vorgelegten Ergebnisse machen für Δ^4-Androsten-3,17-dion noch eine vierte, in biochemischer Hinsicht wichtige Funktion wahrscheinlich: Δ^4-Androsten-3,17-dion dient als spezifischer Wasserstoffacceptor für den C_{17}-Wasserstoff von Oestradiol.

Im wachsenden Uterus trächtiger Ratten findet eine Reduktion der 17-Oxo-Gruppe des Δ^4-Androsten-3,17-dions zur 17-Hydroxy-Gruppe des Testosterons durch von Oestradiol stammenden Wasserstoff nicht statt. Außerdem wurden keine Ring-A-gesättigten Androstan-Derivate gebildet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Ansicht von Jensen und Jakobsen [48], daß der Uterus als Erfolgsorgan der Steroidhormonwirkung am Stoffwechsel der Androgene bzw. der Oestrogene nicht oder nur in begrenztem Umfang beteiligt ist. Nach neuesten Untersuchungen von Lehmann und Breuer [49], die unter weitgehend physiologischen und methodisch leicht überschaubaren Bedingungen gearbeitet haben, findet jedoch eine Oxydoreduktion von Oestradiol im Rattenuterus statt. Die

vorgelegten Ergebnisse können diese Befunde jedoch nicht bestätigen.
In Hoden, Prostata, Samenblase, Niere und Diaphragma fehlt eine Wasserstoff-Übertragung von Oestradiol auf Androgene, was für Prostata, Samenblase, Niere und Diaphragma verständlich ist, da die 17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase-Aktivität verglichen mit der in der Leber erfaßbaren kaum meßbar ist [50].
Da der Hoden als Steroidhormon produzierendes Organ mit dem hauptsächlichen Syntheseprodukt Testosteron über eine hohe 17-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase-Aktivität verfügt und gleichzeitig mit Enzymen zur Ring-A-spezifischen Hydrierung von Δ^4-3-Oxo-Steroiden ausgestattet ist, erscheint unverständlich, daß in Hoden von Ratten keine Tritium-markierten Δ^4-Androsten-3,17-dion-Derivate auffindbar sind, wie die vorliegende Arbeit beweist. Zumal darüber hinaus sich in ihrer spezifischen Enzymausstattung die Steroidhormon synthetisierenden Drüsen [Hoden, Ovar, Nebenniere] nicht qualitativ, sondern nur quantitativ voneinander unterscheiden und im Ovar Tritium-markiertes Testosteron nachgewiesen werden konnte [51,52,53].

D 3. Dient Oestradiol als vorwiegendes Reduktionsmittel bei der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Reduktion?

Aus den Untersuchungen über die Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T im Verhältnis zur Gesamtreduktion bei der Bildung Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Derivate geht die Selektivität der Wasserstoff-Übertragung von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion hervor. In Placenta von Ratten stammen etwa 45% der für die Testosteron-Bildung benötigten Wasserstoff-Atome vom Oestradiol, in Ovarien etwa 80%. Die spezifische Aktivität des in Placentagewebe gebildeten Testosterons-17-T ist von der verwendeten Oestradiol-Konzentration [1 - 55µMol/l] weitgehend unabhängig. Dieser Befund mag auf der fehlenden Verdünnung des zugeführten Oestradiols-17α-T durch endogenes Oestradiol beruhen und ist ein Hinweis dafür, daß das im Gewebe vorhandene Oestradiol - unabhängig von der Konzentration - als bevorzugtes Reduktionsmittel für die Hydrierung von Δ^4-Androsten-3,17-dion verwendet wird. Zu dieser Anschauung passen zwei

weitere Befunde:

a] die relative Ausbeute an Tritium-markiertem Testosteron steigt mit abnehmender Oestradiol-Konzentration.

b] die absolute Ausbeute an Testosteron steigt mit zunehmender Oestradiol-Konzentration im Bereich von 0 - 5µMol/l, während bei höheren Oestradiol-Konzentrationen die Testosteron-Ausbeute konstant bleibt.

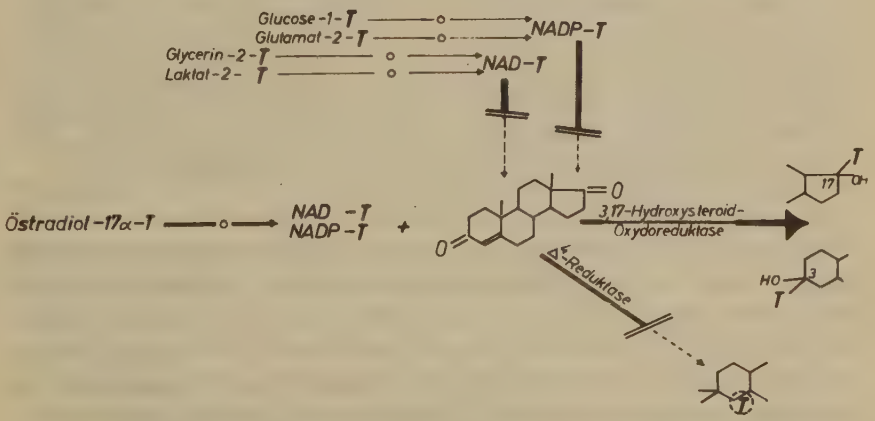
Die spezifische Aktivität des in Lebergewebe weiblicher Ratten gebildeten 5α-Androstan-3α,17ß-diols erreichte nur etwa 10-30% der spezifischen Aktivität des eingesetzten Oestradiols-17α-T. Es war nur eine geringe Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der eingesetzten Oestradiol-Konzentration erkennbar.
In Lebergewebe männlicher Ratten kann dagegen bei Oestradiol-Überschuß die spezifische Aktivität des 5α-Androstan-3,17ß-diols bis zu 100% der spezifischen Aktivität des Oestradiols-17α-T erreichen. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei hohen Oestradiol-Konzentrationen jede Verdünnung des aus dem Oestradiol-17α-T gebildeten NAD-T bzw. NADP-T mit inaktivem NAD-H bzw. NADP-H ausgeschlossen ist. Daher muß die Oxydation von Oestradiol und Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion in einem abgeschlossenen und nicht mit anderen Zellräumen kommunizierenden Raum vor sich gehen [vergleiche den nächsten Abschnitt]. Während in diesem Fall Oestradiol der alleinige Wasserstoffdonator bei der Reduktion des Δ^4-Androsten-3,17-dions ist, wird bei Oestradiol-Konzentrationen von 0,7 - 7µMol/l die Hauptmenge des Δ^4-Androsten-3,17-dions durch nicht Tritium-markierte Pyridinnukleotide reduziert. Jedoch erreicht - wie ein gesonderter Versuch zeigte - die spezifische Aktivität der reduzierten Androgene selbst bei der Oestradiol-Konzentration von 0,3µMol/l und der geringen Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration von 0,7µMol/l noch Werte von 20 - 25% der spezifischen Aktivität des eingesetzten Oestradiols-17α-T.

Hier muß immer noch jedes 4. bis 5. Androgenmolekül mit Hilfe des vom Oestradiol stammenden Wasserstoffs reduziert worden sein, falls ein Tritium-Einbau beim Androstandiol in 3- oder 17-Position angenommen wird. Sind dagegen zwei Atome Tritium im Androstandiol [sowohl in 3- als auch in 17-Stellung] vorhanden, beträgt der Oestradiol-Anteil an der Androgenreduk-

tion nur die Hälfte.
Diese Zahlen über den Anteil des vom Oestradiol stammenden Wasserstoffs für die Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion stellen nur einen unteren Wert dar, wenn ein Isotopie-Effekt [54], der durch einen langsameren Umsatz von Tritium im Vergleich zum Wasserstoff bedingt ist, bei der Tritium-Übertragung angenommen wird.

D 4. <u>Die Kompartimentierung des NAD bzw. NADP und die Stereospezifität der enzymatischen Hydrierung mittels NADP der Doppelbindung in Ring A und der Keto-Gruppen</u>

Wie der Vergleich des relativen Tritium-Einbaus in das Δ^4-Androsten-3,17-dion-Molekül unter Hydrierung der Keto-Gruppen mit Oestradiol-17α-T, Laktat-2-T, Glycerin-2-T, Glukose-1-T und Glutamat-2-T als Tritiumdonatoren beweist, ist die Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in der intakten Leberzelle und im Leberhomogenat von Ratten um den Faktor 1000 gegenüber den anderen Substraten bevorzugt, obwohl mit Hilfe dieser Nicht-Steroide in größerem Umfang NAD-T und NADP-T gebildet wurde, das aber in andere Reaktionswege eingeschleust wurde [siehe folgende Abbildung und Tab. 4 und 5].



Da die 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen sowohl löslich in der Cytoplasmafraktion als auch strukturgebunden in der Mikrosomenfraktion vorhanden sind, läßt diese Tatsache der selektiven Wasserstoff-Übertragung eine strengere - als bisher angenommene - Kompartimentierung von NAD und NADP zumindest im cytoplasmatischen Raum vermuten. Diese Kompartimentierung würde die mehr oder minder unbehinderte Diffusion der wasserstoffübertragenden Coenzyme wesentlich einschränken. Für die Mikrosomenfraktion ist die hohe Selektivität der Wasserstoff-Übertragung zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion verständlich, da die Mikrosomen mit der Struktur der lipoidreichen Doppellamelle - soweit man das heute sagen kann - der Struktur anderer Membranen mit der Eigenschaft der selektiven Permeabilität und des aktiven Transportes entspricht und die Steroide als lipophile Substanzen bevorzugt im Mikrosomen-"Lipoid" gebunden werden. Das bedeutet, daß der Wasserstoffdonator: Oestradiol, der Wasserstoffacceptor: Δ^4-Androsten-3,17-dion und das die Wasserstoff-Übertragung katalysierende Enzym in einem durch eine spezifische Membran umgrenzten Raum eingeschlossen sind, was den Wasserstoff-Transfer durch räumliches Zusammenliegen begünstigt.

Bei der Interpretation dieses Befundes muß jedoch berücksichtigt werden, daß in jüngster Zeit auch die Bindung der Glykolyseenzyme - z.B. Laktat-Dehydrogenase - an bestimmte Zellstrukturen diskutiert wird [55,56]. Nach den Untersuchungen von Th. Wieland und Mitarbeiter [57] ist in Rattenleber zwar die Hauptmenge der Laktat-Dehydrogenase im Homogenat-Überstand nachweisbar, jedoch enthalten auch die Mikrosomen einen geringen Anteil fest gebundener Laktat-Dehydrogenase, so daß die NAD-T-Bildung aus Laktat-2-T und Steroid-Reduktion am gleichen Zellort möglich sein müßte.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß sowohl phenolische Oestrogene wie neutrale Androgene durch die gleiche 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase oxydiert bzw. reduziert werden, bietet sich neben der räumlichen Kompartimentierung eine zweite Möglichkeit zur Erklärung der Selektivität der Wasserstoff-Übertragung zwischen Steroiden an. Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion werden räumlich benachbart am gleichen Enzym gebunden, wobei der auf die Pyridinnukleotide übertragende Wasserstoff direkt auf die Andro-

gene übergeht ohne das eine Dissoziation des Enzym-Coenzym-Substrat-Komplexes eintritt. Es ist zu vermuten, daß Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion nicht am gleichen aktiven Bezirk fixiert werden, da dieses zu einer kompetitiven Hemmung führen würde. Das Gegenteil tritt ein: Erhöhung der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration führt zu einer Erhöhung des Oestradiol-Umsatzes [siehe Abb.7a]. Die Michaelis-Menten-Konstante nimmt bei gleichzeitiger Anwesenheit von Δ^4-Androsten-3,17-dion im Inkubationsmedium ab, was bedeutet, daß die Affinität von Oestradiol zum aktiven Enzymbezirk zunimmt [siehe Abb.20]. Diese Tatsachen sind bemerkenswert, da bei der Strukturähnlichkeit zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion eine kompetitive Hemmung zu erwarten wäre, wenn Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion im Inkubationsmedium gleichzeitig vorhanden sind. Eine Deutung dieser Tatsache kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gegeben werden.

Eine dritte Möglichkeit zur Klärung der Selektivität der Wasserstoff-Übertragung zwischen Steroiden wäre die Stereospezifität der Wasserstoff-Übertragung nicht nur in Bezug auf das Substrat, sondern auch in Bezug auf das Coenzym. Danach reagiert beim NADH bzw. beim NADPH entweder das eine oder das andere epimere Wasserstoff-Atom in Position 4 des Nikotinsäureamidringes, welches als A- und als B-Wasserstoffatom bezeichnet wird [vergleiche Schema Seite 46]. Wie Warren und Mitarbeiter [33] gezeigt haben, entsteht bei der enzymatischen Oxydation von Oestradiol-17α-T mit NAD ausschließlich [4B-T]NADH. Die in Tab.14 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß das in B-Position im NADP-T stehende Tritium gegenüber der A-Position bei der Hydrierung der 4,5-Doppelbindung [Bildung von 5α-Androstan-3,17-dion] und der Ketogruppe in 17-Position von Δ^4-Androsten-3,17-dion bevorzugt ist. Dieses Resultat spricht für die gleiche Stereospezifität in Bezug auf NAD bzw. NADP bei der Oxydation von Oestradiol einerseits und der Wasserstoff-Übertragung auf Δ^4-Androsten-3,17-dion andererseits.

I. Björkhem [58,59] konnte in neuester Zeit zeigen, daß bei der enzymatischen Umwandlung von 7α-Hydroxycholest-4-en-3-on zu 7α-Hydroxy-5α-cholestan-3on - Hydrierung der 4,5-Doppelbindung durch eine spezifische mikrosomale 5α-Reduktase -

ebenfalls eine strenge Stereospezifität der NADP-abhängigen Reaktion besteht. Der Wasserstoff der B-Seite von NADPH wurde in die 5α-Position eingebaut, wobei die B-Form 5 mal wirksamer war als die A-Form.

Da aber bei Inkubationsversuchen mit Leberschnitten aus Glukose-1-T [siehe Seite 15] als Tritiumdonator über 1-T-Glukose-6-phosphat ebenfalls spezifisch markiertes [4B-T]NADPH hergestellt wird und dennoch kein Tritium in das Δ^4-Androsten-3,17-dion-Molekül eingebaut wird, reicht die Stereospezifität zur Erklärung der Selektivität nicht aus.

In diesem Zusammenhang ist es erstaunlich, daß Oestradiol-17α-T spezifisch markiertes NADP-T der B-Form bildet, aber dieses $NADP\text{-}T_B$ ausschließlich die in 17-Position stehende Ketogruppe von Δ^4-Androsten-3,17-dion hydriert unter Bildung von Testosteron und nicht die 4,5-Doppelbindung, obwohl der in B-Position am Nikotinsäureamidring von NADP stehende Wasserstoff spezifisch von der Δ^4-Reduktase verwendet wird [58,59]. Diese Tatsache wirft die Frage auf, ob sogar in der Mikrosomenfraktion eine wesentliche Einschränkung der freien Diffusion der wasserstoffübertragenden Coenzyme und daher eine strenge Kompartimentierung der Pyridinnukleotide vorliegt.

D 5. Hat die spezifische Wasserstoff-Übertragung zwischen Steroiden eine Bedeutung?

Über die Bedeutung des NAD,NADP-abhängigen Wasserstofftransportes zwischen Oestradiol und Androgenen kann für den allgemeinen Zellstoffwechsel wenig gesagt werden. Es bleibt offen, ob die erhobenen Befunde nur eine biochemische "Kuriosität" sind oder eine echte, aber bislang nicht bekannte Zellfunktion beinhalten.

Möglicherweise spielt die NAD,NADP-abhängige wasserstoffübertragende Reaktion eine Rolle im reduktiven Androgenstoffwechsel und bei der biologischen Inaktivierung von Oestrogenen durch Oxydation. Wie bereits erwähnt [Abb.7a], führt eine Zunahme der Δ^4-Androsten-3,17-dion-Konzentration im Inkubationsmedium zu einer Erhöhung der Oxydation von Oestradiol zu Oestron. Bei einer umgekehrten Versuchsanordnung hat eine Zunahme der Oestradiol-

Konzentration im Inkubationsmedium in Gegenwart einer konstanten Menge Δ^4-Androsten-3,17-dion eine Erhöhung der absoluten Menge reduzierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolite zur Folge.

Diese gegenseitig verknüpften oxydoreduktiven Reaktionen zwischen Oestradiol und Androgenen könnten auch eine unmittelbare Steuerung der biologischen Wirkung dieser Hormone bewirken, da die verschiedenen Oxydationsstufen der Oestrogene bzw. die verschiedenen Reduktionsstufen der Androgene eine unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen.
In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß in der Schwangerschaft [60,61,62] der Testosteronspiegel im Plasma der Mutter früh ansteigt. Aus welchen Quellen sich dieses Testosteron im einzelnen rekrutiert, ist noch unklar. Eine stärkere placentare Produktion von Testosteron und Δ^4-Androsten-3,17-dion kommt offenbar nicht in Betracht. Möglicherweise beruht die vermehrte Testosteron-Bildung in der Schwangerschaft auf der beschriebenen oxydo-reduktiven Beziehung zwischen Oestradiol und Androgenen. So wäre die verstärkte Reduktion intermediär im Ovar oder Nebenniere gebildeten Δ^4-Androsten-3,17-dions unter Bildung von Testosteron durch das in der Placenta in großen Mengen produzierte und ins Blut übertretende Oestradiol denkbar.

D 6. Beziehung zur Hypothese der "Transhydrogenase-Funktion" von Hydroxy-Steroiden

Es sei abschließend betont, daß der von Williams-Ashman und Talalay [63] bei Untersuchungen an einem aus menschlicher Placenta gewonnenen Enzymsystems erhobene experimentelle Befund einer "Transhydrogenase-Funktion" des Oestradiols gemäß folgender Gleichung

$$\text{Oestron} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Oestradiol} + \text{NADP}^+$$
$$\text{Oestradiol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Oestron} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+ + \text{NADH}$$

nicht in unmittelbaren Zusammenhang steht mit der hier vorgelegten spezifischen "Transhydrogenase-Funktion" des Oestradiols

bei der Reduktion von Androgenen.Nach der "Transhydrogenase-Funktion" von Williams-Ashman und Talalay,die in Verbindung mit der physiologischen Wirkung von Steroidhormonen gebracht wird,wird in einer reversiblen Oxydoreduktion zwischen Oestradiol und Oestron Wasserstoff zwischen den Pyridinnukleotiden NAD und NADP verschoben.Entsprechende Reaktionen wären auch für Testosteron und Δ^4-Androsten-3,17-dion denkbar.Die vorgelegten Befunde zeigen dagegen die partielle Kopplung der Oestradiol-Oxydation mit der reduktiven Veränderung des Androgen-Moleküls unter obligater Zwischenschaltung der wasserstoffübertragenden Coenzyme NAD oder NADP gemäß folgender Gleichung:

$$\text{Oestradiol} + \text{Androstendion} \xrightarrow[NADP^+]{NAD^+} \text{Oestron} + \text{Testosteron} + \text{Androstandiole}$$

E. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wird die Frage untersucht, ob Oestradiol, das in enger molekularer und biochemischer Beziehung zu Androgenen steht, im Organismus als Reduktionsmittel für die Reduktion des androgenwirksamen Δ^4-Androsten-3,17-dions fungieren kann.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in 17α-Position mit Tritium-markiertes Oestradiol [Oestradiol-17α-T] verwendet. Das sogenannte stoffwechsellabil-gebundene Tritium wird bei der Oxydation der 17-Position von Oestradiol abgespalten. Findet dieses Tritium Verwendung bei der Reduktion von Δ^4-Androsten-3,17-dion, muß es in dessen Reduktionsprodukten auffindbar sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß in der Rattenleber, dem zentralen Stoffwechsel-Organ für die Bildung biologisch inaktivierter ausscheidungsfertiger Endprodukte von Steroiden, und in den primären Sexualhormonsynthesestätten [Placenta und Ovarien] das in 17-Position an Oestradiol-17α-T gebundene Tritium auf Δ^4-Androsten-3,17-dion übertragen wird. Dabei entstehen als Tritium-markierte Reduktionsprodukte des Δ^4-Androsten-3,17-dions in der Rattenleber Testosteron und, da die Ring-A-Reduktasen in ihrer stereospezifischen Wirkung geschlechtsabhängig sind, in weiblichen Tieren das cis-konfigurierte 5α-Androstan-3α,17ß-diol und in männlichen Tieren die trans-konfigurierten Androstandiole, also 5α-Androstan-3,17ß-diol und 5ß-Androstan-3α,17ß-diol. In Placenta und Ovarien ist als Tritium-markierter Δ^4-Androsten-3,17-dion-Metabolit ausschließlich Testosteron nachweisbar. Der Vorgang der Tritium-Übertragung ist gebunden an die Anwesenheit von NAD bzw. NADP.

Im Uterus, in männlichen Sexualorganen wie Hoden, Samenblase und Prostata und in sexualhormonunspezifischem Gewebe wie Niere und Diaphragma läßt sich ein Wasserstofftransfer zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion nicht nachweisen.

Der Tritium-Einbau in die Reduktionsprodukte von Δ^4-Androsten-3,17-dion erfolgt in 3- und/oder 17-Position unter Bildung von Hydroxygruppen, wie durch oxydativen Abbau bewiesen werden konnte.

Die Tritium-Übertragung von Oestradiol-17α-T auf Δ^4-Androsten-3,17-dion ist in der intakten Leberzelle von Ratten um den Fak-

ter 1000 gegenüber anderen Tritium-markierten Substraten wie Glukose-1-T, Glycerin-2-T, Glutamat-2-T und Laktat-2-T, die ebenfalls als Tritium-Donatoren fungieren können, bevorzugt.
Das den Wasserstofftransfer zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion katalysierende Enzymsystem in den Lebermikrosomen wird durch Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums, der Michaelis-Menten-Konstante, der Hemmbarkeit durch SH-Gruppen-blockierende Verbindungen charakterisiert. Die Enzymcharakteristika zeigen Übereinstimmung mit solchen bekannter mikrosomaler 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen, was dafür spricht, daß die 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase einerseits Oestradiol oxydiert und andererseits den spezifischen Wasserstofftransfer von Oestradiol auf Δ^4-Androsten-3,17-dion bewirkt.
Der Wasserstofftransfer zwischen Oestradiol und Δ^4-Androsten-3,17-dion beweist eine enge oxydo-reduktive Verknüpfung des Oestradiol-Stoffwechsels mit dem von Δ^4-Androsten-3,17-dion in Leber, Placenta und Ovarien, die durch andere NAD- bzw. NADP-abhängige Redoxpartner bei weitem nicht erreicht wird. Als Folge davon wird die mögliche Beeinflussung des Stoffwechsels eines Steroids durch die Anwesenheit eines zweiten oxydier- oder reduzierbaren Steroids diskutiert.

F. Literatur

[1] H.Breuer, Steroid-Dehydrogenasen in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiol.- und pathol.-chem.Analyse, 10.Auflage, Bd. 6/A, s.423 Springer, Heidelberg 1964

[2] R.Abraham, E.Balke, K.Krisch, S.Leonhäuser, K.Leybold, K.A. Sach und Hj.Staudinger, Hydrolasen, ebenda S.917

[3] R.I.Dorfman and F.Ungar, Metabolism of steroid hormones, Burgess Publ. Comp., Minneapolis [1953]

[4] L.T.Samuels, Metabolism of the steroid hormones, Prog. in chemistry of fats and other lipids, 3,395 [1955]

[5] Hj.Staudinger und G.Streck, Stoffwechsel des Cholesterins und der Steroidhormone, in Flaschenträger-Lehnartz 2/1b,869 [1954]

[6] G.M.Tomkins, Enzymatic mechanisms of hormone metabolism 1. Oxydation-reduction of the steroid nucleus, Rec. Progr. Hormone Res. 12,125 [1956]

[7] E.Forchielli and R.I.Dorfman, Seperation of Δ^4-5α- and Δ^4-5ß-Hydrogenases from rat liver homogenates, J.biol.Ch., 223,443 [1956]

[8] J.S.McGuire jr. and G.M.Tomkins, The heterogeneity of Δ^4-3-ketosteroidreductases [5α], J.biol.Ch., 235,1634 [1960]

[9] J.S.McGuire jr., V.W.Hallis and G.M.Tomkins, Some characteristics of the microsomal steroid reductases [5α] of rat liver, J.biol.Ch., 235,3112 [1960]

[10] K.Leybold und Hj.Staudinger, DPNH as hydrogen donator for ring A reduction of Δ^4-3-ketosteroids, Arch.Biochem. 96,629 [1962]

[11] K.Leybold und Hj.Staudinger, Sex difference in the steroid metabolism of rat liver cytoplasm, Med.exp., Basel 2,46 [1960]

[12] K.Leybold und Hj.Staudinger, Kinetische Untersuchungen über den Steroidstoffwechsel mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten, Biochem.Z. 331,399 [1959]

[13] G.M.Tomkins, The enzymatic reduction of Δ^4-3-ketosteroids J.biol.Ch. 225,13 [1957]

[14] G.M.Tomkins, A mammalian 3α-hydroxysteroid dehydrogenase, J.biol.Ch. 218,437 [1956]

[15] B.Hurlock and P.Talalay, 3α-hydroxysteroids as coenzymes of hydrogen transfer between di- and triphosphopyridine necleotides, J.biol.Ch. 233,886 [1958]

[16] B.Hurlock and P.Talalay, Microsomal 3α- and 11ß-hydroxysteroid dehydrogenases, Arch.Biochem. 80,468 [1959]

[17] L.J.Langer and L.L.Engel, Human placental estradiol-17ß dehydrogenase, J.biol.Ch. 233,583 [1958]

[18] L.J.Langer, J.A.Alexander and L.L.Engel, Human placental estradiol-17ß dehydrogenase, J.biol.Ch. 234,2609 [1959]

[19] J.Jarabak, J.A.Adams, H.G.Williams-Ashman and P.Talalay, Purification of a 17ß-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta and studies on its transhydrogenase function, J.biol.Ch. 237, 345 [1962]

[20] M.Wenzel und K.Pollow, Die Reduktion von Androgenen durch Oestradiol-17α-T, Z.Physiol.Chem. 348, 1667 [1967]

[21] M.Wenzel und K.Pollow, Die Wasserstoff-Übertragung von Oestradiol-17α-T[17ß] auf Δ^4-Androsten-3,17-dion in den Sexualorganen tragender Ratten, Z.Physiol.Chem. 349, 1357 [1968]

[22] K.Pollow, Unveröffentlichte Arbeiten

[23] M.Wenzel, K.Pollow und B.Pollow-Hanisch, Änderung der Sexualspezifität bei der Androstendionreduktion durch Oestradiol-17ß-Wasserstoff in Rattenleber nach Feminisierung durch Cyproteronacetat, Z.Physiol.Chem., 350, 791 [1969]

[24] K.Leybold und H.J.Staudinger, Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten, Biochem.Z. 331, 389 [1959]

[25] G.Albaum und W.Staib, Über den Metabolismus von Δ^4-Androsten-3,17-dion bei Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen, Biochem.Z. 342, 120 [1965]

[26] H.Schriefers, W.Cremer und M.Otto, Sexualcharakteristika des Stoffwechsels von Testosteron in der perfundierten Rattenleber, Z.Physiol.Chem., 348, 183 [1967]

[27] H.Schriefers, M.Pittel und F.Pohl, On the influence of fasting in the rat on cortisone and carbohydrate metabolism in the liver, Acta endocrinol. [Copenhagen], 40, 40 [1962]

[28] H.J.Hübener und D.Amelung, Enzymatische Umwandlung von Steroiden, 2.Mitteilung, Geschlechtsunterschiede der enzymatischen Leberleistung, Z.Physiol.Chem., 293, 137 [1953

[29] M.Wenzel, H.Kleucker und P.E.Schulze, Verfolgung der in vivo-Oxydation von 17-Hydroxy- zu 17-Ketosteroiden durch Messen der Tritium-Aktivität im Körperwasser, Z.Naturforsch., 21b, 1178 [1966]

[30] B.P.Lisboa, Application of thin-layer chromatography to the steroids of the androstane series, J.Chromatog., 13, 391 [1964]

[31] F.Berthold und M.Wenzel, In Radiochromatic Counting Techniques, in Instrumentation in Nuclear Medicine, Academic Press, New York 1967

[32] H.F.Fischer, E.E.Conn, B.Vennesland and F.H.Westheimer, The enzymatic transfer of hydrogen, J.biol.Ch. 202, 687 [1953]

[33] J.C.Warren and S.G.Cheatum, Stereospecificity of hydrogen transfer by bovine adrenal 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase, Biochem.Bioph.Acta 159, 540 [1968]

[34] W.Stoffel, Dac.LeKim and G.Sticht, Stereospecificity of the

NADPH-depent reduction reaction of 3-Oxodihydrosphingosine [2-Amino-1-hydroxyoctadecane-3-one], Z.Physiol.Chem. 349, 1637 [1968]

[35] W.D.Lehmann und H.Breuer, Charakterisierung und Kinetik einer mikrosomalen 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase der menschlichen Placenta, Z.Physiol.Chem. 348, 1633 [1967]

[36] M.L.Sweat, L.T.Samuels and R.Lumry, Preparation and characterization of the enzyme which converts testosterone to androstenedione, J.biol.Ch. 185, 75 [1950]

[37] H.Hübener und H.Staib, in Biochemie der Nebennierenrindenhormone, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart [1965]

[38] F.E.Yates, A.L.Herbst and J.Urquhart, Sex difference in rate of ring A reduction of Δ^4-3-ketosteroids in vitro in rat liver, Endocrinology 63, 887 [1958]

[39] E.Forchielli, K.Brown-Grout and R.I.Dorfman, Metabolism of steroid hormones, Proc.Soc.exp.Biol.Med., 99, 594 [1958]

[40] B.L.Rubin, Sex differences in orientation of reduction products of 3-keto-C_{19} steroids by rat liver homogenates, J.biol.Ch., 227, 917 [1957]

[41] B.L.Rubin and H.J.Strecker, Further studies on the sex difference in 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase activityes of rat livers, Endocrinology 69, 257 [1961]

[42] Übersicht s. R.I.Dorfman and F.Ungar, Metabolism of steroid hormones, Academic Press, New York 1965

[43] S.R.Stitch, R.E.Oakey and S.S.Eccles, Biosynthesis of estrogen by rat ovaries, Biochem.J. 82, 48P [1962]

R.E.Oakey, S.R.Stitch and S.S.Eccles, Biosynthesis of estrogen by rat ovaries, ebenda 89, 57P [1963]

[44] A.Seeman and R.T.Saracino, Contribution a l etude de la Formation d Androgenes Par l ovaire, Acta endocrinol. [Copenhagen], 37, 31 [1961]

[45] M.De La LuzSuarez Sato e. J.Leqault Demare, Etude de l Activite Biologique en vitro des Hormones Gonadotropes, Acta endocrinol. [Copenhagen], 33, 444 [1960]

[46] W.Y.Huang and W.H.Pearlman, The corpus luteum and steroid hormone formation, J.biol.Ch., 237, 1060 [1962]

[47] H.Schriefers und I.Schmid, Biotransformation von Testosteron in Explantatkulturen von Rattenovarien, Z.Physiol.Chem. 349, 1085 [1968]

[48] E.V.Jensen, Über die Wirkungsweise von Oestrogenen, Dtsch.med.Wschr., 88, 24, 1229 [1963]

[49] W.D.Lehmann und H.Breuer, Nachweis einer Oxydoreduktion von Oestrogenen im Rattenuterus, Naturwissenschaften 55, 182 [1968]

[50] G.Kinson and Ch.Kochakian, DPN and TPN-C_{19}-steroid dehydrogenases and reductases in accessory sex tissues, Am.J.Physiol., 206, 443 [1964]

[51] M.Stylianou, E.Forchielli and R.I.Dorfman, The metabolism of the 4-^{14}C-Testosterone in rat testis homogenate, J.biol.Ch., 236, 1317 [1960]

[52] K.Brown-Grout, E.Forchielli and R.I.Dorfman, The Δ^4-hydrogenases of guinea pig adrenal gland, J.biol.Ch., 235, 1317 [1960]

[53] R.I.Dorfman, K.M.Menon and D.Toren, Biosynthesis of steroid hormones in the testis, Folia Endoc.Jap., 40, 922 [1964]

[54] M.Wenzel und P.E.Schulze, in Tritium-Markierung, Verlag Walter de Gruyter u.Co., Berlin, 1962

[55] Th.Bücher und M.Klingenberg, Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation, Angew.Chem. 70, 552 [1958]

[56] H.Hultin and C.Westport, Factors affecting the distributio of lactate dehydrogenase between particulate and non-particulate fractions of homogenized skeletal muscle, Arch.Biochem.Biophysics, 117, 523 [1966]

[57] Th.Wieland, G.Pfleiderer und F.Ostanderl, Über die Unterschiede der Milchsäure-Dehydrogenasen, Biochem.Z. 331, 103 [1959]

[58] O.Berseus and I.Björkhem, Enzymatic conversion of a Δ^4-3-ketosteroid into a 3α-hydroxy-5ß-steroid: Mechanism and stereochemistry of hydrogen transfer from NADPH, European J.Biochem. 2, 503 [1967]

[59] I.Björkhem, Mechanism and stereochemistry of the enzymatic conversion of a Δ^4-3-oxosteroid into a 3-oxo-5α-steroid, ebenda 8, 345 [1969]

[60] J.Tamm, Der Testosteronstoffwechsel beim Menschen Dtsch.med.Wschr. 92, 2037 [1967]

[61] K.Harper, Effects of androstenedione on early pregnancy in the hamster, Endocrinology 80, 1152 [1967]

[62] L.Ainsworth and K.J.Ryan, Steroid hormone transformations by endocrine organs from pregnant mammals. 1. Estrogen biosynthesis by mammalian placental preparations, Endocrinology 79, 875 [1966]

[63] P.Talalay and H.G.Williams-Ashman, 1. Mechanisms of hormone action, Participation of steroid hormones in the enzymatic transfer of hydrogen, Recent Progr.Hormone Res. 16, 1 [1960

Lebenslauf

Als Sohn des Oberregierungsrates Dr.jur.Herbert Pollow und seiner Ehefrau Clara,geb. Herrmann,wurde ich am 4.1.1943 in Berlin geboren.Mein Vater fiel als Hauptmann d.Res. an der Ostfront 1942.

Am 4.März 1963 legte ich am Robert-Koch-Gymnasium in Berlin die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1963 begann ich in Berlin an der Freien Universität mit dem Studium der Medizin,das ich am 11.Februar 1969 mit dem Staatsexamen abschloß.

Vom August 1966 bis zum Dezember 1967 war ich mit der Anfertigung der Dissertation als Doktorand im Institut für Physiologische Chemie [Dir. Prof.Dr.Dr.E.Schütte] an der Freien Universität beschäftigt.

Seit dem 1.März 1969 bin ich als Medizinalassistent am Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität in Berlin tätig.

Am 22.November 1968 heiratete ich Fräulein Barbara Hanisch, chem.-biol. Assistentin aus Berlin.